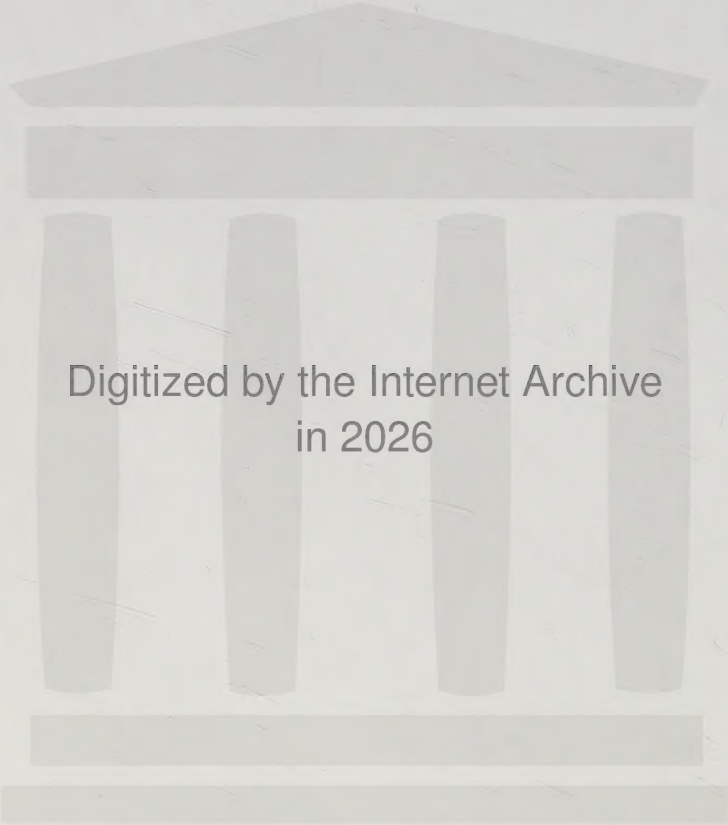


UNTERSUCHUNGEN ZUR INDUZIERTEN BILDUNG
VON BENZOPHENANTHRIDINALKALOIDEN
BEI ZELLKULTUREN VON
ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA

HEINZ MARTIN SCHUMACHER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0091

Untersuchungen zur induzierten Bildung von
Benzophenanthridinalkaloiden bei Zellkulturen
von Eschscholtzia californica

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig - Maximilians - Universität
zu München

vorgelegt
von
Heinz Martin Schumacher
aus
Hückeswagen

Januar 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. H. Zenk
 2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. J. Stöckigt
- Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 1987

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung.....	1
II. Material und Methoden.....	18
1. Material.....	18
1.1. Biologisches Material.....	18
1.1.1. Pflanzenmaterial.....	18
1.1.2. Verwendetes Pilzmaterial.....	19
1.1.3. Bakterienzellwandpräparate.....	20
1.2. Chemikalien.....	20
1.3. Geräte.....	22
2. Methoden.....	25
2.1. Chromatographische Methoden.....	25
2.1.1. Dünnschicht-chromatographi- sche Methoden.....	25
2.1.2. Methoden der Hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie...	26
2.1.3. HP-Gelpermeationschromato- graphie zur Zuckeranalyse.....	27
2.1.4. Gaschromatographische Zuk- keranalyse.....	27
2.1.5. Gaschromatographischer Nach- weis von Ethylen.....	27
2.2. Synthesen und Derivatisierungen.....	28
2.2.1. Zuckeracetylierung zur gas- chromatographischen Zucker- analyse.....	28
2.2.2. Synthese ³ H-markierter Dihy- drobenzophenanthridinal- kaloide.....	28

II

2.3. Enzymtestverfahren.....	30
2.3.1. (S)-Norlaudanosolin-Synthase...	30
2.3.2. (S)-Adenosylmethionin:(R,S)- Norretikulin-N-Methyltrans- ferase.....	30
2.3.3. Berberin-Brücken-Enzym.....	31
2.3.4. (S)-Tetrahydroprotoberberin- Oxidase.....	32
2.3.5. (S)-Adenosylmethionin:(S)-7, 8,13,14-Tetrahydroberberin- N-Methyltransferase.....	32
2.3.6. Dihydromacarpin-Oxidase.....	33
2.4. Methoden zur Proteinbestimmung.....	33
2.5. Methoden zur Bestimmung des Zucker- gehaltes.....	34
2.6. Zellaufschluß zum Nachweis von En- zymaktivität in einem Saccharose- Dichtegradienten.....	34
2.7. Elektronenmikroskopische Methoden.....	35
III. Ergebnisse.....	36
1. Analyse des Alkaloidgehaltes der Zell- kulturen und seine Veränderung nach Pilzinfektionen.....	36
1.1. Variante Stämme aus Zellkulturen von <u>Eschscholtzia californica</u>	36
1.2. Farbliche Veränderungen bei Stamm W einer Zellkultur von <u>Eschscholtzia</u> <u>californica</u> durch Pilzinfektion.....	38
1.3. Qualitative Analyse der Inhaltsstoffe der Zellkulturen von <u>Eschscholtzia</u> <u>californica</u>	40
1.4. Quantitative Analyse von Inhaltsstof- fer varianten Zellkulturstämmen und der Ganzpflanze von <u>Eschscholtzia</u> <u>californica</u>	46

1.5. Untersuchung des Infektionsphänomens auf chemischer Grundlage.....	50
1.5.1. Qualitative Analyse des Infektionsphänomens.....	50
1.5.2. Quantitative Analyse der induzierten Alkaloidbildung.....	54
2. Entwicklung eines Testsystems zur Ermittlung der Aktivität von Elicitorpräparaten.....	57
3. Charakterisierung des Elicitors.....	63
3.1. Partielle Reinigung des Elicitors.....	63
3.1.1. Fraktionierte Ethanol-fällung...	63
3.1.2. Dialyse.....	65
3.1.3. Adsorption an XAD.....	66
3.1.4. Fällung mit Fehlingscher Lösung.....	67
3.1.5. Gelchromatographie.....	68
3.1.6. Adsorption an DEAE-Cellulose...	70
3.2. Charakterisierung des Elicitorpräparates.....	74
3.2.1. Analyse der über Chromatographie an DEAE-Cellulose gewonnenen Elicitorpräparate.....	74
3.2.2. Fällung mit Trichloressigsäure.	75
3.2.3. Elicitorverdau durch Proteinase K.....	76
3.2.4. Spaltung mit Perjodat.....	77
3.2.5. Gleichzeitige Anwendung des Hefeelicitors mit Methylmannose.....	78
4. Untersuchungen zur Spezifität der Beziehung von "Elicitor" und "Phytoalexin".....	80

4.1. Induktion der Benzophenanthridin-synthese durch verschiedene Elicitorpräparate.....	80
4.1.1. Untersuchung der Elicitoraktivität verschiedener Pilzkulturen.....	80
4.1.2. Induktion der Benzophenanthridinbildung durch andere Elicitorpräparate.....	81
4.1.3. Elicitoraktivität verschiedener Zuckerpolymere.....	83
4.1.4. Elicitoraktivität bakterieller Zellwandzucker.....	84
4.2. Wirkung des isolierten Hefepräparates auf Zellkulturen verschiedener Pflanzenarten.....	88
5. Untersuchungen zur Physiologie der induzierten Alkaloidbildung bei <u>Eschscholtzia californica</u>	101
5.1. Benzophenanthridinbildung bei etiolierten Keimlingen von <u>Eschscholtzia californica</u>	101
5.2. Induzierte Benzophenanthridinbildung bei Zellkulturen (Stamm W) durch Calciumverarmung.....	105
5.3. Untersuchungen zum Zusammenhang von Alkaloidakkumulation und Ethylenbildung bei Stamm W von <u>Eschscholtzia californica</u>	106
5.4. Induktion von Enzymaktivitäten bei Stamm W nach Zusatz von Hefeelictor zum Kulturmedium.....	113
5.4.1. Enzyme aus der Biosynthese der Protoberberinalkaloide.....	113
5.4.2. Entwicklung eines Testverfahrens für eine Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase.....	116
5.4.3. Enzyminduktion in verschiedenen Stadien einer Wuchskurve einer Kultur von Stamm W.....	119

5.4.4.	Induktion von Enzymaktivitäten unmittelbar nach Elicitorzugabe zu einer Kultur von Stamm W der Art <u>Eschscholtzia californica</u>	121
6.	Reinigung und Charakterisierung der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase.....	128
6.1.	Testsystem und Produktnachweis.....	128
6.2.	Enzymreinigung.....	130
6.2.1.	Gewebeaufschluß zur Enzymextraktion.....	130
6.2.2.	Ammoniumsulfatfällung.....	132
6.2.3.	Entsalzen von Proteinlösungen.....	133
6.2.4.	Chromatographie an DEAE-Sepharose.....	135
6.2.5.	Chromatographie an CM-Cellulose.....	135
6.2.6.	FPLC an dem Säulenmaterial Mono-Q.....	136
6.2.7.	Reinigungsschema für die Dihydrobenzophenanthridin Oxidase.....	139
6.3.	Charakterisierung der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase.....	141
6.3.1.	Protein- und Zeitabhängigkeit der Enzymreaktion.....	141
6.3.2.	Temperaturabhängigkeit der Enzymreaktion.....	143
6.3.3.	pH Optimum der Enzymreaktion...	143
6.3.4.	Substratspezifität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase.....	145
6.3.5.	Molekulargewichtsbestimmung....	148
6.3.6.	Ermittlung des IEP der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase.....	149

6.3.7. Nachweis des Cosubstrats für die Oxidation des Dihydromar- carpins.....	151
6.3.8. Einfluß von Hemmstoffen auf die Enzymreaktion.....	153
6.3.9. Einfluß von Metallionen auf die Enzymreaktion.....	155
7. Untersuchungen zur Cytologie der indu- zierten Alkaloidbildung bei Zellkul- turen (Stamm W) von <u>Eschscholtzia</u> <u>californica</u>	156
7.1. Mikroskopische Untersuchungen.....	156
7.2. Elektronenmikroskopische Analyse von elicitorbehandelten Zellen von Stamm W.....	160
7.3. Untersuchungen zur Kompartimentie- rung von Enzymaktivitäten.....	165
7.4. Untersuchung des Alkaloidgehaltes im Saccharose-Dichtegradienten.....	172
7.5. Elektronenmikroskopische Analyse der roten Banden im Saccharose-Dichte- gradienten.....	173
IV. Diskussion.....	178
V. Zusammenfassung.....	207
VI. Literaturverzeichnis.....	211

Verwendete Abkürzungen:

ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
Bq	Bequerel (1 Zerfall pro Sekunde)
CI	Chemische Ionisation
Ci	Curie ($3.7 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$, $2.22 \times 10^{12} \text{ dpm}$)
CM	Carboxymethyl-
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	Direkte chemische Ionisation
DEAE	Diethylaminoethyl-
dpm	desintegrations per minute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoß Ionisation
FID	Flammenionisationsdetektion
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IEP	Isoelektrischer Punkt (pH Wert bei dem die Nettoladung eines Zwitterions 0 ist)
kat	Katal (Enzymmenge, die 1 mol Substrat pro Sekunde umsetzt)
LS	Zellkulturmedium nach Linsmaier und Skoog
M ⁺	Molekularpeak
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
min	Minute
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (Phosphat)
psi	pound per square inch (1 psi = 0.0689 bar)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tricin	N-(tris(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
v	Chemische Reaktionsgeschwindigkeit
Upm	Umdrehungen pro Minute
% w/v	Volumenprozent
% w/w	Gewichtsprozent

I. EINLEITUNG

Nachdem in den Jahren 1838 und 1839 Schleiden und Schwann die Zelltheorie formuliert, aber noch nicht sicher bewiesen hatten, bemühte sich in den frühen Jahren des 20ten Jahrhunderts vor allem der Botaniker HABERLANDT in Berlin darum, durch Anlage von Zellkulturen die Totipotenz einzelner pflanzlicher Zellen nachzuweisen. Das Prinzip der Totipotenz besagte, daß das gesamte physiologische Potential der differenzierten Pflanze in jeder einzelnen Zelle vollständig vorhanden sein sollte. Jede einzelne Zelle sollte demzufolge auch allein lebensfähig sein. Es gelang HABERLANDT (1902 und 1913) aber nur Zellaggregate für wenig mehr als 20 Tage am Leben zu erhalten. Eine Teilung der Zellen zu erreichen gelang HABERLANDT trotz Anwendung von Nährlösungen allerdings nicht. Kultiviert wurden die Zellen in Knopscher Lösung, der eine Kohlenstoffquelle (Rohrzucker oder Traubenzucker) sowie Glyzerin, Asparagin und Pepton zugesetzt war (HABERLANDT 1913). Die Anlage von ersten Kalluskulturen gelang GAUTHERET 1934 durch Verwendung meristematischer Gewebe. Die Kulturen stellten allerdings nach einiger Zeit ihr Wachstum wieder ein. Wirkliche pflanzliche Zellkulturen, das heißt unbegrenzt teilungsfähige Zellen, erhielt man erst, nachdem gegen Ende der dreißiger Jahre Auxin zur Anlage von Zellkulturen verwendet worden war (NOBECOURT 1938, GAUTHERET 1939).

In der Folgezeit wurde die Anlage von Pflanzenzellkulturen - vor allem bedingt durch den Fortschritt der pflanzlichen Hormonphysiologie - immer mehr zu einer Routinesache. Mit der Zahl der in Kultur genommenen Pflanzenarten wuchs in den folgenden Jahren auch die Zahl der Berichte über die bio-

synthetischen Fähigkeiten solcher Zellkulturen. Eine Reihe von Autoren beschrieb die Bildung einer Vielzahl von pflanzlichen Sekundärmetaboliten durch Zellkulturen wie Alkaloiden, Flavonoiden, Cardenoliden, Pigmente und von Lignin (vergl. CAREW und STABA 1965). Im Jahre 1954 gelang MUIR et al. zum ersten Mal die Anlage einer submers, das heißt in flüssigem Medium wachsenden Zellkultur (MUIR et al. 1954). Die Möglichkeit der Anlage submers wachsender pflanzlicher Zellkulturen im technischen Maßstab und die große technische und pharmazeutische Bedeutung pflanzlicher Sekundärmetabolite ließen schon früh den Gedanken an eine industrielle Produktion solcher Substanzen mit Hilfe von pflanzlichen Zellkulturen entstehen (TULECKE und NICKELL 1960). Bei diesen Überlegungen hat in der damaligen Zeit wohl auch die erst kurz zuvor erfolgreich begonnene industrielle Produktion des revolutionären Arzneistoffes Penicillin mit Hilfe von Pilzkulturen Pate gestanden. So schrieben beispielsweise TULECKE und NICKELL 1959 über pflanzliche Zellkulturen: "In essence, these cell cultures represent a new class of microorganisms...".

Auf die großen Hoffnungen folgten allerdings zunächst Ernüchterungen. In den meisten Fällen von Sekundärstoffproduktion durch Zellkulturen wurde der Gehalt der Ganzpflanze nicht überschritten. 1973 konnte TEUSCHER nur von einem Fall berichten, in dem der Sekundärstoffgehalt einer Zellkultur höher war als der der Ganzpflanze. Unter Berücksichtigung der hohen Fermentationskosten für pflanzliche Zellkulturen war eine Sekundärstoffproduktion damit unwirtschaftlich. In vielen anderen Fällen zeigten Zellkulturen aber auch gar keine Sekundärstoffproduktion (TABATA 1977). In den sechziger Jahren wurde mehrfach von Zellkulturen berichtet, die einige Zeit nach

ihrer Anlage die Fähigkeit zur Sekundärstoffproduktion verloren hatten (TEUSCHER 1973). In anderen Fällen schien die Produktion von Sekundärmetaboliten an die Differenzierung von Pflanzenzellen gekoppelt zu sein. Beispiele für Substanzen, die in entdifferenzierten Zellen nicht mehr gebildet werden, sind Menthol (WANG und STABA 1963), Tropanalkaloide (HIRAOKA et al. 1973), Tetrahydrocannabinol (ITOKAWA et al. 1965) und nicht zuletzt die interessanten Alkaloide Morphin und Codein (FURUYA et al. 1972).

Trotz dieser Beispiele zeigte sich aber auch, das das alte Konzept der Totipotenz einzelner Pflanzenzellen nicht aufgegeben werden mußte. Nach HABERLANDTS vergeblichen Versuchen war es erstmals und unwiderlegbar 1958 durch die Regeneration einer intakten Pflanze aus einzelnen kultivierten Zellen einer Kultur von Daucus carota bewiesen worden (STEWARD et al. 1958). Solche Regenerationen waren nach zum Teil mehrjähriger Kultivierung von Zellkulturen noch möglich (TEUSCHER 1973) und lieferten voll lebensfähige, intakte Pflanzen. Es ließ sich sogar in mehreren Fällen nachweisen, daß Zellkulturen, die die Fähigkeit zur Produktion bestimmter Sekundärstoffe verloren hatten, Pflanzenregenerate mit einem normalen Spektrum an Sekundärmetaboliten hervorbrachten. Beispiele hierfür sind Papaver somniferum (IKUTA et al. 1974), Ruta graveolens (CYZGAN 1975) und Pimpinella anisum (BECKER 1970).

In anderen Fällen konnte eine normale Sekundärstoffproduktion auch schon beobachtet werden, wenn in einer Kultur durch Hormonzugabe Zelldifferenzierungen herbeigeführt wurden oder spontan auftraten. So bildeten zum Beispiel Zellkulturen von Scopolia parviflora kaum noch Tropanalkaloide; die Zugabe von Indoleessigsäure löste bei diesen Suspensionskulturen nicht nur eine Wurzelbildung aus, sondern führte auch

zur Restitution der Tropanalkaloidbildung (TABATA et al. 1972). LUCKNER und DIETRICH (1986) berichten die Expression einer normalen Biosynthese von Herzglykosiden beim Auftreten somatischer Embryonen in Zellkulturen von Digitalis lanata. Schließlich konnte in Zellkulturen von Papaver bracteatum, in denen es zur Bildung vereinzelter Milchröhrenzellen gekommen war, ein zwanzigfach erhöhter Gehalt an Thebain gegenüber Kulturen ohne Differenzierungen gemessen werden (KUTCHAN et al. 1985).

Schließlich sind auch Beispiele dafür bekannt, daß morphologisch entdifferenzierte Kulturzellen in der Lage sind, Sekundärstoffe zu bilden, deren Auftreten in der Pflanze an Differenzierungen gebunden ist. Hierzu nennen TABATA und Mitarbeiter (1976) die Bildung des Shikonins in entdifferenzierten Zellkulturen. Diese Substanz tritt in der Pflanze nur im Korkmantel der Wurzelrinde auf.

Die Möglichkeit der Produktion von Sekundärmetaboliten läßt sich nach diesen Erfahrungen mit einem Satz von Zenk zusammenfassen: "The totipotency of the plant cell demonstrates that all necessary genetic and physiological potential for product formation is present in the isolated cell, yet, we have to find the key (effector, trigger) to open the door..." (ZENK 1978).

Dieser Schlüssel ist bis heute sicher noch nicht gefunden worden, allerdings hat es eine ganze Reihe vielversprechender Ansätze zur Steigerung des Sekundärstoffgehaltes in Zellkulturen gegeben, die auch das Wissen um die Biosynthese von Naturstoffen und ihre Regulation wesentlich vorangebracht haben.

Ein solcher Ansatz ist die bereits besprochene Auslösung von Differenzierungsvorgängen in Zellkultu-

ren oder die Anlage von Organkulturen. Erwähnt wurden bereits die Beispiele der Bildung von Tropanalkaloiden durch Wurzelkulturen von Scopolia parviflora (TABATA et al. 1972) und die Bildung von Herzglykosiden durch Digitalis lanata und Digitalis purpurea (LUI und STABA 1979, GARVE et al. 1980). Ein weiteres Beispiel ist die Bildung der pharmazeutisch interessanten Alkaloide Chinin und Chinidin durch Zellkulturen von Cinchona ledgeriana. Bis heute ist es auch durch Variation der Medienzusammensetzung oder durch Zufütterung von biosynthetischen Vorstufen nicht gelungen, die Bildung dieser Substanzen in entdifferenzierten Suspensionskulturen auszulösen (WIJNSMA et al. 1986). Von der Bildung erwähnenswerter Mengen an Chinin (0.101 mg/g Trockengewicht) und Chinidin (0.27 mg/g Trockengewicht) in submers wachsenden Wurzelkulturen von Cinchona ledgeriana berichten ANDERSON et al. (1982). Eine industrielle Realisierung solcher Methoden scheint gegenwärtig aber unwirtschaftlich.

Ein weiterer Ansatz zur Steigerung der Sekundärstoffproduktion von Zellkulturen besteht in der Variation des Kulturmediums. Neben einer unspezifischen Verbesserung der Wachstumsbedingungen für die Zellkulturen könnte hierbei 1. durch den Einsatz von Pflanzenhormonen eine chemische Differenzierung eingeleitet werden, ohne begleitende morphologische Differenzierungen, 2. könnten durch Fütterung von biosynthetischen Vorstufen limitierende Schritte einer Biosynthesekette umgangen, oder ausgefallene ersetzt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß in einigen Fällen Veränderungen im Nährstoffangebot zu Veränderungen des Sekundärstoffmetabolismus führen. In vielen Fällen konnte die Bildung einzelner Substanzen durch Erhöhung des Saccharosegehaltes im Medium gesteigert werden (ZENK und DEUS 1982, SCHÜBEL 1986). Im Gegen-

satz dazu berichten IKEDA et al. (1976a) von einer Abnahme der Ubiquinon-10 Produktion bei Tabakzellkulturen durch erhöhte Zuckerkonzentrationen im Kulturmedium.

Der Zusatz von Pflanzenhormonen zum Kulturmedium kann bei Zellkulturen Differenzierungsphänomene und damit eine wieder einsetzende Sekundärstoffproduktion zur Folge haben. Es ist aber auch eine Vielzahl von Fällen bekannt, in denen der Einsatz solcher Hormone zu einer vermehrten Produktion eines gewünschten Stoffes führte, ohne morphologische Differenzierungen auszulösen. Den Einfluß von Hormonen auf die Nicotinbildung in Kulturen von Nicotiana tabacum untersuchten TABATA et al. (1971). Umfangreiche Versuche zum Einfluß verschiedener Auxine auf die Anthrachinonbildung durch Zellkulturen von Morinda citrifolia beschreiben ZENK et al. (1975). In beiden Fällen zeigte sich, daß Biosynthesewege durch den Einsatz von Hormonen sowohl stimuliert als auch gehemmt werden können.

Auch für erfolgreiche Zufütterung von biosynthetischen Vorstufen zur Steigerung der Sekundärstoffproduktion ließ sich im Laufe der Zeit eine Vielzahl von Beispielen finden (HIRAOKA et al. 1973, ZENK et al. 1975, TABATA et al. 1976).

Bei Anwendung verschiedener Medien zur Anzucht sekundärstoffbildender Zellkulturen erwies sich häufig, daß Medien, die zu einer besonders hohen Produktbildung führten, das Wachstum der Zellen hemmen konnten. Auf der anderen Seite waren Medien, die zu einem schnellen Wachstum der Zellen führten, häufig nicht geeignet, hohe Ausbeuten an Sekundärmetaboliten zu erzielen. Solche Erfahrungen führten zur Entwicklung des Konzeptes spezieller Wachstumsmedien auf der einen und Produktionsmedien auf der anderen Seite (ZENK et al. 1977).

Ein weiteres, häufig im Zusammenhang mit der Sekundärstoffproduktion bei Zellkulturen beobachtetes Phänomen ist das Auftreten varianter Zellen (ZENK et al. 1978), also von Zellen mit sehr hohem und sehr geringem Sekundärstoffgehalt in einer Zellkultur. Aus Zellkulturen, die dieses Merkmal aufwiesen, konnten durch Selektion geeigneter Zellen Stämme mit außerordentlich hohen Sekundärstoffgehalten gewonnen werden. Hierbei wurden die unterschiedlichsten Auswahlmethoden verwendet. Stämme mit hohem Shikoningehalt konnten von MIZUKAMI et al. (1978) durch Selektion nach Farbe gewonnen werden. Für die Selektion auf Gehalt an fluoreszierenden Alkaloiden verwendeten ZENK und DEUS (1982) die Fluoreszenzmikroskopie. Die sensitivste und universellste Methode zur Bestimmung des Sekundärstoffgehaltes von kleinsten Zellkolonien zur Selektion stellten WEILER 1977 mit der Verwendung des Radioimmuntests vor.

Durch solche Methoden der Selektion nach Farbe und Fluoreszenz einzelner Zellen wurden von Frau Dr. Deus an unserem Institut die varianten Stämme aus Zellkulturen von Eschscholtzia californica angelegt, die auch den Gegenstand dieser Arbeit bilden (DEUS 1980).

Neben den beschriebenen Mechanismen der Steigerung des Sekundärstoffwechsels entdeckte man in Zellkulturen aber auch induzierbare Stoffwechselleistungen, die schon aus differenzierten Pflanzen bekannt waren. Die durch Licht induzierte Aktivitätszunahme der Phenylalanin-Ammonium-Lyase, eines Schlüsselenzyms aus dem Phenylpropanstoffwechsel, war ein seit langem bekanntes Phänomen. Diese Lichtinduktion beim Phenylpropanstoffwechsel und der daran anschließenden Biosynthese der Flavone und Flavonoide wurde von HAHLBROCK auch an Zellkulturen von Petroselinum hortense und Glycine max (L) Merill untersucht.

Hierbei zeigte sich eindeutig, daß auch in den Zellkulturen durch Licht eine Aktivitätszunahme einer ganzen Reihe von Enzymen aus diesem Stoffwechselweg induziert werden konnte (HAHLBROCK et al. 1971, HAHLBROCK und GRISEBACH 1979). Dies bot nicht nur eine Möglichkeit der Steigerung des Sekundärstoffgehaltes; die Zellkultur lieferte damit auch ein gutes Studienobjekt zur Untersuchung der Induktionsmechanismen selbst.

Neben dem Beispiel der Lichtinduktion des Sekundärstoffwechsels ist in jüngster Zeit auch das Phänomen der Phytoalexinbildung als Mittel zur Steigerung des Sekundärstoffgehaltes von Zellkulturen diskutiert worden. Phytoalexine sind Abwehrstoffe, die von einigen Pflanzen als Reaktion auf eine Infektion durch Pilze oder Bakterien gebildet werden. Auch Zellkulturen phytoalexinbildender Pflanzen reagieren mit einer verstärkten Produktion solcher Sekundärmetabolite auf den Kontakt mit Pilzen.

Darüberhinaus bieten sich aber hier Zellkulturen auch als ein hervorragendes System an, biochemische und physiologische Grundlagen dieses Phänomens auf zellulärer Ebene zu studieren. Die Phytoalexinbildung bei Pflanzen ist ein relativ junges Forschungsgebiet. Trotzdem hat sie in letzter Zeit große Fortschritte gemacht und dabei unser Bild vom evolutionären Sinn des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels nicht unwesentlich gewandelt. Hierbei ist eine Sichtweise aktuell geworden, die im letzten Jahrhundert nicht unüblich war. Der bedeutende Botaniker KERNER VON MARILAUN (1890) sah sekundäre Pflanzenstoffe als Schutzstoffe der Pflanze und E. STAHL (1888) hat diese Ansicht im letzten Jahrhundert durch Experimente mit herbivoren Schnecken bereits experimentell untersucht (vergl. HARTMANN 1985). Daneben wurde aber der Umstand gesehen, daß den Pflanzen im Gegensatz zu den Tieren ein Exkretionssystem, insbesondere für

Endprodukte des N-Stoffwechsels fehlte. Außerdem hatte man die biosynthetischen Beziehungen vieler Naturstoffe, vor allem der Alkaloide, zum Aminosäurestoffwechsel erkannt. Folgerichtig sahen viele Biochemiker in der Speicherung von sekundären Pflanzenstoffen in den riesigen Vakuolen der Pflanzenzelle gewissermaßen ein Exkretionssystem nach innen (WINTERSTEIN et al. 1910). Nicht zuletzt die Entdeckung der Phytoalexine hat heute zu einer Renaissance der alten, mehr ökologischen Sichtweise geführt.

Das Prinzip der Phytoalexinbildung erkannten Müller und Börger bei der Erforschung der Phytophthora-Resistenz der Kartoffel (MÜLLER 1941). Die intensive Erforschung der Kartoffelfäule mit dem Ziel der Gewinnung resistenter Varietäten geschah nicht aus akademischem Interesse. Im neunzehnten Jahrhundert war es durch das Auftreten dieser Krankheit zu teilweise dramatischen Hungersnöten gekommen. Traurige Berühmtheit hat die als "Great Famine" bekannte Hungersnot in Irland von 1845-1851 erlangt. In dieser Zeit sank die irische Bevölkerung durch Auswanderung oder Hungertod um zwei Millionen Menschen (ungef. 25 % der Gesamtbevölkerung) (GREEN 1978).

Im Jahr 1941 konnten MÜLLER und BÖRGER zwar noch keine in ihrer Struktur aufgeklärte Substanz benennen, es gelang ihnen aber bereits klar nachzuweisen, daß die Resistenz bestimmter Kartoffelvarietäten gegenüber Pilzen der Gattung Phytophthora auf der Produktion einer Abwehrsubstanz beruhen mußte. Solchen pflanzlichen Abwehrsubstanzen gaben sie den Namen Phytoalexine. Phytoalexine sollten nach der Definition von Müller und Börger niedermolekulare Substanzen mit antimikrobiellem Charakter sein, die von einer Pflanze postinfektionell zur Abwehr eines Pathogens gebildet werden.

In der Folgezeit wurde eine Vielzahl verschiedener Substanzen aus den verschiedensten Pflanzenarten isoliert, die der Definition von Müller genügten. Bemerkenswert ist nicht nur die strukturelle Vielfalt sondern auch die taxonomische Verbreitung dieses Prinzips. Die größte strukturelle Vielfalt zeigen hierbei die Substanzklassen der Terpenoide und der Isoflavonoide. Die Angehörigen dieser Gruppen zählen auch zu den am längsten bekannten und am intensivsten untersuchten Phytoalexinen. Ursache hierfür ist zweifellos die überragende agronomische Bedeutung der sie bildenden Pflanzen wie Reis, Kartoffeln, Bohnen, Erbsen, aber auch Kaffee, Tabak und Baumwolle. Das am besten untersuchte System ist die durch den Pilz Pytophthora megasperma induzierte Glyceollin Bildung der Sojabohne (Glycine max) (vergl. BROOKS und WATSON 1985).

Anders als im Falle der Terpenoide und Isoflavonoide sind Alkaloide mit Phytoalexincharakter erst in jüngster Zeit bekannt geworden. Das erste Beispiel waren die Avenalumine, die 1981 von MAYAMA et al. im Hafer gefunden wurden. Kurz danach berichteten WOLTERS und EILERT (1982) über die durch Pilz induzierte Bildung von Rutacridon-Epoxiden in Zellkulturen von Ruta graveolens. Die zuletzt bekannt gewordenen Beispiele sind die durch Pilzzellwände induzierte Bildung von Sanguinarin in Zellkulturen von Papaver somniferum (EILERT et al. 1985) und die verstärkte Bildung von Berberin in Zellkulturen von Thalictrum tuberosum nach Behandlung mit Hefezellwandbestandteilen (BRODELIUS et al. 1986). Interessant sind auch die Berichte von WINK (1983) über die Steigerung des Gehalts an Lupinenalkaloiden in Blättchen von Lupinus polyphyllus nach Verwundung, obwohl dies nicht den klassischen Begriffsdefinitionen entspricht.

MÜLLER (1941) definierte nicht nur den Begriff des Phytoalexins, er vermutete auch bereits, daß die Phytoalexinbildung auslösende Prinzip könne eine Substanz sein, die vom Pilz ausgehe. KEEN et al. (1972) prägten für eine solche Substanz die Bezeichnung Elicitor. Die Suche nach Elicitoren und nach dem Mechanismus, durch den sie die Phytoalexinbildung bewirken, ist bis heute eines der interessantesten Probleme der Phytopathologie.

Es zeigte sich hierbei, daß häufig nicht nur das Pathogen in der Lage ist, die Bildung von Phytoalexinen auszulösen, sondern auch andere mehr oder weniger unspezifische Streßfaktoren wie Kältebehandlung und UV-Bestrahlung (BRIDGES und KLARMAN 1973). Auch viele Chemikalien erwiesen sich als Elicitoren, so zum Beispiel Schwermetallsalze (GUSTINE 1981) und Substanzen wie N-Ethylmaleimide, p-Hydroxymercuribenzoat und DDT (vergl. BROOKS und WATSON 1985). Sie lösen auch beim gut untersuchten System der Sojabohne die Bildung des Phytoalexins Glyceollin aus (STOESSEL und LEUBA 1984).

Das wichtigere Problem, vor allem für die Phytopathologie, ist aber die Erforschung des Elicitorprinzips der pflanzenpathogenen Organismen.

Die erste, genauer charakterisierte Substanz, die aus einem pflanzenpathogenen Organismus isoliert wurde und Elicitorcharakter hatte, war ein Peptid. CRUICKSHANK et al. (1968) isolierten dieses Peptid aus dem Fruchtparasiten Monilinia fruticola. Es war in der Lage bei Phaseolus vulgaris die Bildung der Phytoalexine Phaseollin und Phaseollidin auszulösen. Da aber der Parasit, aus dem das Peptid isoliert wurde, die Bohne nicht befällt, und andererseits das isolierte Peptid bei den eigentlichen Wirten des Parasiten keine Phytoalexinbildung auslöst, ist seine Rolle bis heute umstritten.

In den Jahren 1976 bis 1984 gelang Albersheim die

Charakterisierung eines Glucan-Elicitors aus Phytophthora megasperma. Dieser Elicitor löst die Glyceollin-Produktion bei der Sojabohne aus. Da der Pilz auch in freier Natur ein häufiger Parasit der Sojabohne ist, handelt es sich hier also nicht um ein artifizielles System. Im Jahr 1976 berichtete ALBERSHEIM (siehe hierzu AYERS et al. 1976 a,b,c und EBEL et al. 1976) von der Isolation von Zuckermolekülen mit Elicitoraktivität sowohl aus den Kulturfiltraten als auch aus den Zellwänden von Phytophthora megasperma. Die Substanzen, die aus dem Kulturfiltrat isoliert wurden, bestanden zu 95 % aus Glucose, enthielten aber auch kleine Mengen von Mannose und Galaktose. Das Molekulargewicht der Substanzen schwankte zwischen 40 000 und 2 500 Dalton. Aus den Zellwänden verschiedener Rassen von Phytophthora megasperma konnte die Arbeitsgruppe von Albersheim durch Chromatographie an DEAE-Cellulose und Affinitätschromatographie an Concannavalin A vier verschiedene Substanzfraktionen gewinnen, die alle in der Lage waren, bei Sojabohnenkotyledonen die Phytoalexinproduktion auszulösen. Die Fraktionen enthielten in unterschiedlicher Zusammensetzung Protein und Zuckerkomponenten. Aus diesen Ergebnissen schloß Albersheim auf eine in allen Fraktionen enthaltene, kleinste Komponente, die den eigentlichen Elicitor darstelle. In der Folgezeit gelang es, eine solche Komponente zu isolieren und genau zu charakterisieren. Es handelte sich um ein 1-6 verzweigtes β -1-3 Heptaglucan, dessen exakte Struktur 1984 endgültig aufgeklärt (SHARP et al. 1984) und durch Synthese bestätigt wurde (OSSOWSKI et al. 1984).

Neben diesem bislang am besten charakterisierten Elicitor wurden noch verschiedene andere isoliert. Chitosan, ein polymeres Glucosamin, isoliert aus Fusarium solani, bewirkt die Bildung des Pisatins bei Erbsen (WAGONER et al. 1981). Bei Tomaten wirken aus

Cladosporium fulvum isolierte Glycoproteine als Elicitoren. In diesem Fall ist sowohl der Zuckerteil, als auch der Proteinteil des Moleküls für die Elicitorwirkung notwendig (DE WIT et al. 1981).

Ein ganz anderes Elicitorprinzip wurde von WEST (1981) beschrieben. West und seine Mitarbeiter untersuchten die bei Infektion durch Rhizopus stolonifer gesteigerte Produktion von Diterpenen in Keimlingen von Ricinus communis. Hierbei zeigte sich, daß nicht ein Zellwandbestandteil des Pathogens die Phytoalexinbildung auslöste, sondern eine vom Pilz exkretierte Polygalakturonase (LEE und WEST 1978). Weitere Arbeiten zeigten, daß diese Polygalakturonase einen Zuckerbestandteil aus der pflanzlichen Zellwand löste, der auch allein appliziert, die vermehrte Bildung der Diterpene in Gang setzte (BRUCE und WEST 1982). Eine genauere Analyse ergab, daß es sich bei dem aktiven Zuckermolekül um eine Polygalakturonsäure handelte. Die stärkste Aktivität hatte ein Polymer aus dreizehn Galakturonsäureeinheiten (JIN und WEST 1984).

Auch der Gruppe um Albersheim gelang es etwa zur gleichen Zeit, aus der Zellwand von Sojabohnen ein Zuckermolekül mit Elicitoraktivität zu isolieren. Es handelte sich ebenfalls um eine Polygalakturonsäure, die allerdings im Aktivitätstest mit Sojabohnenkeimlingen eine deutlich geringere Aktivität zeigte als der schon erwähnte Glucanelicitor (NOTHNAGEL et al. 1983). Ein Jahr später gelang der Nachweis, daß beim System der Sojabohne neben der beschriebenen Induktion der Phytoalexinbildung durch Zellwandbestandteile des Pathogens, auch ein ähnlicher Mechanismus vorkommen kann, wie West ihn beschrieben hatte. Bei Untersuchungen mit einem anderen Parasit, dem Bakterium Erwinia carotovora, konnte ebenfalls eine exkretierte Polygalakturonase isoliert werden. Die von diesem Enzym aus Sojabohnenzellwänden abgespaltenen

Polygalakturonsäuren lösten ebenfalls die Glyceollinbildung aus (DAVIS et al. 1984). In jüngster Zeit konnte Albersheim nachweisen, daß die verschiedenen beschriebenen Prinzipien im System der Sojabohne bei der Auslösung der Abwehrreaktion synergistisch wirken können (DAVIS et al. 1986).

Albersheim schließt aus den geschilderten Ergebnissen auf das universelle Vorhandensein von potentiellen Elicitormolekülen in der pflanzlichen Zellwand. Die schon erwähnten, unspezifischen Elicitoren wie Kälte, UV-Bestrahlung oder Schwermetallsalze könnten durch Freisetzung solcher Substanzen wirken.

Während also eine Reihe von Substanzen bekannt und gut charakterisiert ist, die Phytoalexinbildung auslösen können, ist der Mechanismus, mit dem sie das tun, auch heute noch weitgehend unbekannt. Von verschiedenen Autoren wird ein Einfluß der Pflanzenhormone Abscisinsäure, Kinetin und Benzylaminopurin auf die Menge an gebildetem Phytoalexin beschrieben (GOOSSENS et al. 1981). Die interessantesten Untersuchungen über die Beteiligung von Pflanzenhormonen machten CHAPPELL et al. (1984) an Zellkulturen von Petroselinum hortense. Bei diesen Zellkulturen führt der Kontakt mit Phytophthora-Zellwänden zu einer sehr schnellen Einleitung der Phytoalexinbildung. Noch früher setzt auch eine Bildung des Pflanzenhormons Ethylen ein. Trotzdem zeigte sich das Ethylen nur Begleiter und nicht Verursacher der Phytoalexinbildung ist. Auch Calcium Ionen (KAUSS 1986) scheinen an der Auslösung der pflanzlichen Abwehrreaktion beteiligt zu sein.

Sicher nachgewiesen werden konnte aber schon, das am Ende dieser noch unbekannten Kausalkette zumindest im Falle der Bildung von Isoflavonoidphytoalexinen bei Bohne (Phaseolus vulgaris) und Sojabohne (Glycine

max) die differentielle Aktivierung von Genen steht. Nachdem schon früher bekannt war, daß es nach Einwirkung von Elicitoren auf Zellkulturen von Petersilie und Sojabohnen zu Aktivitätszunahmen verschiedener Enzyme des Flavonoidstoffwechsels kommt, konnten 1984 zwei Arbeitsgruppen durch Hybridisierungsexperimente mit cDNA dieser Enzyme nachweisen, daß dies auf eine Zunahme des Gehaltes an mRNA der Enzyme in den Zellen zurückgeht. Die Aktivitätszunahme der Enzyme beruht also auf einer verstärkten Transkription ihrer Gene (CHAPPEL et al. 1984, CRAMER et al. 1984). Mit den gleichen Techniken wurde auch nachgewiesen, daß diese differentielle Genaktivierung im Fall der Sojabohne in Zellkulturen genauso abläuft wie bei der Ganzpflanze (SCHMELZER et al. 1984).

Seine Arbeiten zur Phytoalexinbildung und hier vor allem der Nachweis von "endogenen Elicitoren" hat PETER ALBERSHEIM (1985) zu sehr weitreichenden Spekulationen über die Rolle von Zuckerbestandteilen der pflanzlichen Zellwand bei Morphogenese und Regulation veranlaßt. Er glaubt, daß sie universellen Hormoncharakter in Pflanzen haben und hat seine These durch morphogenetische Arbeiten gestützt. Albersheim konnte zeigen, daß die Zugabe von definierten Xyloglucan-Polymeren in geringsten Konzentrationen das auxinstimulierte Wachstum von Erbsenstengeln hemmt. In Zusammenarbeit mit einer französischen Arbeitsgruppe gelang es bei Tabakexplantaten durch Zugabe von Zuckerfraktionen aus Bergahornzellwänden Gewebedifferenzierungen zu Sprossen, Wurzeln und Blüten auszulösen. Die Tabakexplantate wurden dabei auf Medien kultiviert, die Auxine und Cytokinine in zum Teil tausendfach höheren Konzentrationen enthielten als die zugesetzten Zucker (VAN et al. 1985).

Nach der Theorie die Albersheim aus diesen Ergebnissen entwickelt sollen Zuckermoleküle, die er Oli-

gosaccharine nennt, die eigentlichen und spezifischen Hormone der Pflanze darstellen. Die bisher als Pflanzenhormone geltenden Substanzen wie Auxine, Gibberelline, Cytokinine sowie Abscisinsäure und Ethylen stellen für ihn ein übergeordnetes Prinzip dar. Die Wirkung dieser pleiotropen Pflanzenhormone soll durch Herauslösen verschiedener spezifisch wirkender Oligosaccharine aus Zellwänden unterschiedlicher Gewebearten zustande kommen.

An dieser Stelle lohnt es sich, an den Anfang unserer Ausführungen zurückzukehren. Sollten solche Oligosaccharine tatsächlich Pflanzenhormone sein, deren Wirkung sehr viel spezifischer ist als die der bisher bekannten, könnte sich durch ihre Anwendung beim Versuch der Sekundärstoffproduktion mit pflanzlichen Zellkulturen ein Weg öffnen, chemische Differenzierungen wie Sekundärstoffbildung von morphologischen zu trennen.

Abschließend sei noch eine verblüffende Beobachtung geschildert, die WINK et al. (1983) veröffentlichten. Es gelang den Autoren, den Gehalt von Chinolizidine Alkaloiden in Zellkulturen von Lupinus polyphyllus durch Zugabe verschiedener "Elicitoren" wie Spermidin, Cadaverin oder cAMP zu steigern. Überraschenderweise konnten sie aber auch in Zellkulturen von Spinat (Spinacia oleracea) und Karotte (Daucus carota) solche Alkaloide in sehr geringen Mengen feststellen und auch in diesem Fall ließen sich die Gehalte der Zellkulturen durch die gleichen "Elicitoren" steigern.

Haberlandt schrieb 1902 zur Begründung seiner "Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen": "Es sind meines Wissens noch keine planmäßig angelegten Versuche gemacht worden, isolierte vegetative Zellen von höher entwickelten Pflanzen in geeigneten Nährlö-

sungen zu kultivieren. Und doch müßten die Ergebnisse solcher Kulturversuche manches interessante Streiflicht auf die Eigenschaften und Fähigkeiten werfen, die die Zelle als Elementarorganismus in sich birgt,..." (HABERLANDT 1902). Die Erkenntnisse der Phytoalexinforschung haben gezeigt das die Fähigkeiten der Pflanzenzelle, auch der kultivierten Pflanzenzelle, gerade in Hinsicht auf ihren Sekundärmetabolismus viel größer sind als bislang angenommen. Die Anwendung von Elicitoren bei pflanzlichen Zellkulturen und die Erforschung ihrer Wirkmechanismen könnten zumindest einen Schlüssel zu jener Tür zu Tage fördern, die den Weg zur industriellen Anwendung von pflanzlichen Zellkulturen öffnet.

Der konkrete Ausgangspunkt zu der vorliegenden Arbeit war eine zufällige Beobachtung in unserem Zellkulturlabor. Durch Selektion nach Farbe und Fluoreszenz waren am Institut vier Stämme aus einer Zellkultur der Pflanze Eschscholtzia californica angelegt worden (Deus 1980). Diese Stämme wurden in der Zellkultursammlung unseres Hauses routinemäßig propagiert. Die farbliche Varianz reichte von tiefrot bis fast farblos. Eine hierbei aufgetretene Kontamination eines weißen Stammes durch Pilze führte zu drastischen Farbänderungen der Kultur. Die vorher fast farblose Kultur nahm eine tiefrote Farbe an. Kurz zuvor hatte Dr. TANAHASHI in einem roten Zellkultur-Stamm der gleichen Pflanze das rot gefärbte Benzophenanthridinalkaloid Macarpin gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die Frage untersucht werden, ob die beschriebenen Farbänderungen der Eschscholtzia Zellkultur ebenfalls auf einer induzierten Sekundärstoffbildung beruhen und damit im Rahmen des Phytoalexinkonzeptes erklärt werden können, oder ob die Pilzinfektion die Aufhebung der durch Selektion erreichten Varianz der verschiedenen Zelllinien bewirkt.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Biologisches Material

1.1.1. Pflanzenmaterial

Die verwendeten pflanzlichen Zellkulturen entstammten der Sammlung des Instituts für Pharmazeutische Biologie. Für die Anzucht wurden, wie im speziellen Fall beschrieben, folgende Medien verwendet:

1. LS Medium nach LINSMAIER et al. (1965),
2. 4X Medium nach GAMBORG et al. (1968), modifiziert nach ZENK et al. (1977),
3. B5 Medium nach GAMBORG et al. (1968).

Für die Anzucht von Kalluskulturen wurde dem Medium Agar in einer Konzentration von 1 % zugesetzt.

Die Suspensionskulturen wurden in Erlenmeyer-Kolben mit einem Volumen von 100 ml (enthalten 25 ml Medium), 300 ml (enthalten 75 ml Medium) oder 1 l (enthalten 250 ml Medium) sowie Fernbachkolben von 1.5 l Volumen (enthalten 1 l Medium). Die Kolben wurden mit 100 Upm auf Rotationsschüttlern geschüttelt und waren einem Dauerlicht von 600 lux ausgesetzt. Die Anzuchttemperatur betrug 23° Celsius. Die Subkultivierung der Suspensionskulturen der verschiedenen Pflanzenarten der Gattung Eschscholtzia, insbesondere der verschiedenen Zellkulturstämme von Eschscholtzia californica, erfolgte in strengem 7 Tage Rhythmus.

Das Zellmaterial wurde durch Abtrennen des Mediums über Vakuumfiltration erhalten. Es wurde entweder direkt verwendet oder mit N₂ (l) schockgefroren und

bei -20° C aufbewahrt.

Die untersuchten Ganzpflanzen wurden am Institut für Pharmazeutische Biologie in Frühbeeten oder Gewächshäusern kultiviert. Sie waren aus Samen verschiedener botanischer Gärten angezogen worden.

Die Anzucht etiolierter Keimlinge von Eschscholtzia californica erfolgte auf 1.5 %tigem Wasseragar. Die dazu verwendeten Samen entstammten hauseigener Ernte. Für die Anzucht der Pflanzen, sowie für die Bereitstellung der Samen danke ich unserem Gärtner Herrn Franz Meyer.

1.1.2. Verwendetes Pilzmaterial

Die aus kontaminierten Zellkulturen von Eschscholtzia californica gewonnenen und nicht näher bestimmten Pilze P1, P2 und P3 wurden, soweit sie für Experimente Verwendung fanden, in flüssigem, oder mit 1 % Agar verfestigtem LS-Medium angezogen. Die Anzucht flüssiger Kulturen erfolgte in 100 ml Erlenmeyerkolben die 50 ml Medium enthielten. Sie wurden bei Raumtemperatur auf einem Rotationsschüttler mit 100 Upm geschüttelt. Für den routinemäßigen Erhalt der Pilze wurden Kulturen auf Kartoffelmedium angezogen. Zum gleichen Zweck wurden in flüssigem LS-Medium angezogene Pilzkulturen zu 10 % mit Glycerin versetzt eingefroren und bei -20° C aufbewahrt.

Bei der verwendeten Hefe handelte es sich um normale, im Einzelhandel käufliche Bäckerhefe. Verwendet wurde das Produkt "Hefe DHW Vital Gold" der Deutschen Hefewerke Hamburg/Nürnberg. Die Aufarbeitung der Hefe erfolgte in der beschriebenen Weise (Kapitel III. 1.5.2.).

Die übrigen verwendeten Pilze wurden von Prof. Oberwinkler, Tübingen bezogen. Im einzelnen handelte es sich um Kulturen von: *Armillaria mellea* (FO 24049

n); *Botryobasidium subcoronatum* (FO 24472); *Tremella mesenterica* (FO 24610); *Rhodosporidium spec.* (FO 25517i); *Hyphodontia pallidula* (FO 25161); *Protoomyces macrosporus* (FO 25646-1); *Dacrymyces stillatus* (FO 28136); *Endophyllum sepmervivi* (FO 28236); *Coelosporium tussilaginis* (FO 28237); *Hyphoderma prae-terminisum* (FO 31753); *Sebacina penetrans* (FO 31759); *Microstroma juglandis* (FO 32601); *Chlorosplenium aeruginosum* (FO 34660); *Corticium caeruleum* (FO 35226); *Auriscalpium vulgare* (FO 36151). Die Pilze wurden auf Kartoffelmedium, das mit 3 % Agar verfestigt wurde, angezogen.

1.1.3. Bakterienzellwandpräparate

Zellwandpräparationen der folgenden Bakterienarten wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. F. Fiedler, Institut für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um Zellwandpräparationen folgender Bakterienstämme: *Brevibacterium butanicum* ATCC 21196; *Br.flavum* ATCC 13826; *Br.lactofermentum* ATCC 13655; *Br.glutamigenes* ATCC 13747; *Br.flavum* ATCC 14067; *Br.ammoniagenes* ATCC 6872; *Corynebacterium hydrocarboclastum* ATCC 15592; *C.nephridii* ATCC 11425; *C.paurometab.* ATCC 8368; *C.lilium* ATCC 15990; *C.striatum* ATCC 6940; *C.petrophilum* ATCC 19080; *C.fascians* ATCC 12975; *C.fascians* 1 (Stolp); *C.fascians* 2 (Stolp); *C.xerosis* ATCC 373 ZW/Tryp; *C.diphtheriae* ZW/Tryp; *C.diphtheriae* ZW/Tryp/SDS; *C.diphtheriae* "Arabinogalactan". Die mit (Stolp) bezeichneten Stämme von *Corynebacterium fascians* waren Prof. Fiedler von Prof. Stolp, Bayreuth, zur Verfügung gestellt worden. Ausgangsmaterial für die aus *Corynebacterium diphtheriae* gewonnenen Präparate war der Stamm Mass. 8. Er wurde Prof. Fiedler von den Behringwerken, Marburg,

zur Verfügung gestellt. Die Bezeichnungen ZW, Tryp, SDS und "Arabinogalactan" beziehen sich auf verschiedenen Aufarbeitungsarten.

1.2. Chemikalien

Referenzsubstanzen folgender Alkaloide wurden von Prof. Nagakura, Kobe, zur Verfügung gestellt: Sanguinarin, Chelilutin, Chelirubin. Macarpin war als Referenzsubstanz von Dr. Tanahashi am Institut isoliert worden. Von der Firma Roth, Karlsruhe, wurden folgende Alkaloide bezogen: Chelerythrin, Sanguinarin, Allocryptopin, Chelidonin. Aus der Sammlung des Instituts für Pharmazeutische Biologie wurden von Frau Dr. Rüffer folgende Alkaloide zur Verfügung gestellt: Magnoflorin, Scoulerin, Cryptopin, Stylopin.

Die auf Elicitoraktivität getesteten Substanzen Chitosan, Nigeran, Poly-L-Lysin, Ribonuclease, Actinomycin sowie die beiden Mannane wurden von der Firma Sigma Chemie, München, bezogen.

Die für die verschiedenen Enzymtests benötigten Substanzen entstammten alle den Beständen des Instituts für Pharmazeutische Biologie. Im einzelnen wurden zur Verfügung gestellt: von Frau Löffler para-Hydroxyphenylacetaldehyd, Dihydroxyphenylacetaldehyd, Dopamin und 2,6-³H-Dopamin (1.3 GBq/mmol); von Herrn Frenzel wurden zur Verfügung gestellt (R,S)-Norretikulin, (S)-Retikulin, (S)-Adenosylmethionin, (S)-(NC³H₃)-Retikulin (6.64 GBq/mmol) und (S)-Adenosyl-L-C³H₃-Methionin (2.89 GBq/mmol); von Frau Dr. Rüffer wurden zur Verfügung gestellt Canadin, (S)-Scoulerin und (R,S)-(8,14-³H₂)-Scoulerin (12.2 GBq/mmol). Das für die Reduktion der Benzophenanthridinalkaloide benutzte NaB³H₄ wurde bezogen von Amersham International plc, Buckinghamshire UK. Es hatte eine spezifische Aktivität von 10.4 GBq/mmol.

Trennmedien für die Enzymreinigung waren DEAE-Cellulose DE-52 (Whatman) und CM-Cellulose (Whatman). Eichproteine für die Molekulargewichtsbestimmung wurden bis auf Myoglobin von Sigma, München, bezogen. Myoglobin lieferte Serva, Heidelberg. Chemikalien für die Chromatofokussierung, nämlich Polybuffer 94-Exchanger und Polybuffer 96, wurden von Pharmacia, Freiburg, bezogen. Morin, Dicoumarol und Thioglykolsäure wurden von Sigma, München; N-Ethylmaleinimid von Serva, Heidelberg, und o-Phenantrolin von Merck, Darmstadt, geliefert.

Die für die Isolation von Protoplasten benutzten Substanzen Maycellase und Pectinol D wurden von Welling Chemie, Hamburg, bezogen.

Für die Elektronenmikroskopie wurden bezogen Bleicitrat, Osmiumtetroxid und Spurrs Lösungen von der Firma Science Service, München. Natriumcacodylat und Glutardialdehyd-Lösung wurde von Merck, Darmstadt, und Tricin von Sigma, München, bezogen.

1.3. Geräte

UV-Spektren wurden an einem DMR-11 Spektralphotometer der Firma Zeiss (Oberkochen) aufgenommen. Extinktionsmessungen zur optischen Bestimmung von oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden wurden mit dem Microplate Reader MR 600 (Firma Dynatech, Alexandria USA), durchgeführt. Dazu verwendet wurden PS-Mikrotiterplatten F-Form (Firma Greiner).

Massenspektren wurden mit einem Quadrupolmassenspektrometer Modell MAT 44S der Firma Varian gemessen. Es wurde, wie im einzelnen angegeben, Elektrosprayionisation oder chemische Ionisation benutzt. Im letzteren Falle wurde als Stoßgas Isobutan verwendet.

Für die Messung des pH-Wertes und der Leitfähigkeit von Lösungen wurde ein Digitalmeter Modell Digi

610 (WTW, Weilheim) verwendet. Ein Abbe-Refraktometer der Firma Zeiss (Oberkochen) wurde zur Bestimmung von Zuckerkonzentrationen verwendet.

Die HPLC-Analyse von Alkaloidgemischen und Pflanzenextrakten wurde mit Geräten der Firmen Spectra Physics (Darmstadt) und Millipore/Waters (Eschborn) durchgeführt. Die Waters Anlage bestand aus zwei HPLC-Pumpen vom Typ "Model 510" und dem Gradientensteuergerät "Model 680". Sie war mit einem automatischen Probengeber vom Typ "Waters Wisp 710B" ausgerüstet. Die UV-Detektion erfolgte mit dem Photometer "Lambda max Model 481", die Auswertung mit dem "Waters Data Module 740". Die Anlage der Firma Spectra Physics bestand aus der integrierten Pump- und Steuereinheit "SP 8700" mit niederdruckseitiger Mischung des Lösungsmittelgradienten, einem automatischen Probengeber vom Typ "SP 8780", dem UV/vis Detektor "SP 8440" und dem Integrator "SP 4200". Die für analytische Arbeiten verwendeten HPLC-Säulen hatten Abmessungen von 4 mm x 250 mm und waren mit dem Säulenmaterial "Nucleosil C₁₈ 10 µm" gefüllt. Zum Schutz der Trennsäule wurden Vorsäulen der Größe 4 mm x 50 mm verwendet, die mit dem Material "Vydac SC-201 RP" gefüllt waren. Die Säulen wurden von der Firma Bischoff (Leonberg) bezogen und auch gefüllt. Das Säulenmaterial lieferte die Firma Macherey und Nagel (Düren). Für präparative HPLC-Trennungen wurde eine Anlage der Firma Gilson/Abimed (Langenberg) benutzt. Sie bestand aus folgenden Komponenten: zwei HPLC-Pumpen vom Typ "Model 303" und der Gradientensteuereinheit "Model 702 Vers.1.2" und dem Pulsationsdämpfer "Model 803", dem UV-Detektor "Model 111" und dem Fraktionskollektor "Model 201". Die verwendete Trennsäule hatte die Abmessungen 16 mm x 250 mm, die Vorsäule 16 mm x 50 mm. Die präparativen Säulen waren mit dem gleichen Material gefüllt wie die analytischen. Bezugsquellen für Säulen, Säulenpackung

und Säulenmaterial waren ebenfalls gleich.

Für Zentrifugationen stand eine Sorvall Zentrifuge RC 58 (Rotoren SS34, GSA, GS3) (Du Pont Instruments, USA) zur Verfügung. Ultrazentrifugation wurde mit dem Gerät L2 (Rotoren Spinco SW 25.2) der Firma Beckman (München) durchgeführt. Für die Zentrifugation kleiner Volumina stand eine Tischzentrifuge vom Typ 5412 der Firma Eppendorf (Hamburg) zur Verfügung.

Konventionelle chromatographische Verfahren zur Enzymreinigung wurden an einer Anlage der Firma LKB (Gräfelfing) durchgeführt, bestehend aus dem Fraktionssammler Ultrorac 7000, einer Varioperpex 12000 Pumpe, dem UV-Detektor Uvicord III und dem Gradientenformer Ultrograd 11300.

Für die Gelpermeationschromatographie (GPC) stand ebenfalls eine Anlage der Firma LKB (Gräfelfing) zur Verfügung. Die verwendeten Geräte tragen die Bezeichnung LKB 2150 (HPLC-Pumpe), Uvicord SD LKB 2158 (UV-Detektor), LKB 2201 (Schreiber). Dazu wurde ein Fraktionskollektor der Firma Gilson Model 201 verwendet. Die für GPC-Trennungen verwendete Säule trug die Bezeichnung LKB 2135-365 Ultropak TSK G 3000 SV. Die Abmessungen waren 21.5 x 600 mm.

Trennungen nach dem relativ neuen Prinzip der Fast-Liquid-Chromatographie (FPLC) wurden mit Geräten der Firma Pharmacia (Freiburg) durchgeführt. Die Anlage bestand aus zwei Pumpen vom Typ "P 500", dem integrierten Gradientensteuer- und Auswertegerät LCC 500, dem UV-Detektor UV-1 und dem Fraktionskollektor Frac 100. Verwendet wurde eine Säule mit dem Material Mono-Q und den Abmessungen 5 x 50 mm. Die Säule wurde ebenfalls von der Firma Pharmacia (Freiburg) bezogen.

Die Messung der Radioaktivität in Lösungen wurde mit dem Szintillationsmeßgerät Betaszint BF 5004 durchgeführt. Die Messung der Radioaktivitätsverteilung auf Dünnschichtchromatogrammen wurde mit dem Dünnschichtscanner LB 2722-2 durchgeführt. Beide

Geräte stammten von der Firma Berthold (Wildbad).

Mikroskopische Untersuchungen wurden mit dem Photomikroskop II der Firma Zeiss (Oberkochen) durchgeführt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Siemens Elmiskop 101 gemacht. Ihre planimetrische Auswertung erfolgte mit dem Gerät MOP AM 02 der Firma Kontron. Die Aufnahme elektronenmikroskopischer Bilder und ihre Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. G. Wanner, Botanisches Institut der Universität München.

2. Methoden

2.1. Chromatographische Methoden

2.1.1. Dünnschicht-chromatographische Methoden

Die Trennung von Alkaloiden mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie erfolgte auf Kieselgelplatten der Firma Macherey und Nagel (Düren) mit der Bezeichnung Polygram Sil G/UV₂₅₄. Kieselgelplatten für präparative Auftrennungen wurden mit einem Streichgerät der Firma Desaga selbst hergestellt. Das verwendete Material war Kieselgel GF₂₅₄ Typ 60 (Merck, Darmstadt). Das Material wurde mit Wasser gemischt im Verhältnis 1 : 1,2 / Kieselgel : H₂O. Die Schichtdicke war 1,5 mm.

Für die Chromatographie wurden folgende Laufmittel verwendet:

Lf1	Toluol : Aceton : Essigester	7 : 2 : 1
Lf2	Cyclohexan : Diethylamin	9 : 1
LF3	n-Hexan : Ether	6 : 1
Lf4	n-Butanol : H ₂ O : Essigsäure	4 : 5 : 1

2.1.2. Methoden der Hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie

Zur HPLC-Analyse von Pflanzenextrakten wurde eine analytische Säule mit den Abmessungen 4 mm x 25 mm benutzt. Das Füllmaterial war Nucleosil C₁₈ 10 µm. Zur Schonung der analytischen Trennsäule war eine Säule mit den Maßen 4 mm x 50 mm vorgeschaltet, die mit dem Material Vydac SC-201 RP gefüllt war. Mit einem automatischen Probengeber wurden im Regelfall 20 µl der zu untersuchenden Lösung in das Trennsystem eingebracht. Mit Hilfe eines elektronischen Gradientensteuergerätes erfolgte die Trennung der Substanzen durch Anwendung eines Lösungsmittelgradienten zwischen folgenden Komponenten: Komponente A = 95 % Wasser / 5 % Acetonitril / 0.01 % Phosphorsäure; Komponente B = 10 % Wasser / 90 % Acetonitril / 0.01 % Phosphorsäure. Der Gradient wurde in folgender Weise programmiert (die verwendeten Geräte siehe Kapitel II. 1.3.):

t (min)	Komp.A (%)	Komp.B (%)
0	100	0
34	53	47
36	35	65
50	24	76
51	0	100
56	0	100
60	100	0

Durch die Programmierung wurde am Ende eines Trennlaufes automatisch die Säule für 5 min mit Komponente B gewaschen und anschließend mit Laufmittelkomponente A wieder equilibriert, so daß ein automatischer Betrieb möglich wurde. Der Start der nächsten Analyse durch den automatischen Probengeber erfolgte in diesem Fall nach 70 min. Die verwendete Flußrate betrug 3 ml/min. Der Druck lag während der Analyse abhängig von der Laufmittelzusammensetzung zwischen 700 und 1500 PSI. Die Detektion der Substanzen erfolgte über Messung der Absorption bei 280 nm oder 490 nm.

2.1.3. HP-Gelpermeationschromatographie zur Zucker-Analyse

Verwendet wurde hierzu ein Säulensystem der Firma Waters (μ -Porasil u. μ Bondagel 125). Zum Schutz der Trennsäule war eine 10 cm lange Vorsäule der Firma Bischoff, gefüllt mit dem Material I-125 (Waters, Eschborn), vorgeschaltet. Eluens war 0.2 M Phosphatpuffer (pH 6.0). Die Flußrate war 16 ml/h. Das Volumen der applizierten Probenlösung betrug 15 μ l. Ihr Substanzgehalt war 2 %. Als Eichsubstanzen für die Molekulargewichtsbestimmung wurden Dextrane der Firma Pharmacia verwendet: Dextran T 10, Dextran T 40, Dextran T 70, Dextran T 110, Dextran T 500, Dextran T 2000.

2.1.4. Gaschromatographische Zuckeranalyse

Nachgewiesen wurden Zuckeracetate. Die verwendete Säule trug die Bezeichnung Glas 6 ft x 2 cm GP 3% SP 2330 auf 100/120 Supelcoport. Als Trägergas wurde Argon verwendet. Der Fluß betrug 20 - 30 ml/min. Die Analyse wurde bei 225° C isotherm durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit FID. Aufgegeben wurden die Zuckeracetate in 1 ml Dichlormethan gelöst.

2.1.5. Gaschromatographischer Nachweis von Ethylen

Das für den Ethylennachweis verwendete System bestand aus einer Säule mit den Abmessungen 3 Fuß x 1/8 Zoll der Firma Varian. Füllmaterial war Poropak R 80-100 mesh. Als Trägergas wurde N₂ mit einem Fluß von 30 ml/min verwendet. Die Ethylenbestimmung erfolgte über FID Detektion. Detektorgase waren H₂ (Fluß: 30 ml/min) und Preßluft (Fluß: 300 ml/min).

Die Detektionstemperatur betrug 175°C , die Injektor-temperatur 150°C und die Säulentemperatur 40°C . Die Retentionszeit des Ethylens betrug beim verwendeten System 40 sec.

2.2. Synthesen und Derivatisierungen

2.2.1. Zuckeracetylierung zur gaschromatographischen Zuckeranalyse

Derivatisiert wurde jeweils 1 mg der zu analysierenden Zuckerproben. Sie wurden in 1 - 3 ml Trifluor-essigsäure aufgenommen und in Glasampullen mit 5 ml Volumeninhalt eingeschmolzen. Die Hydrolyse erfolgte für 1.5 h bei 121°C im Trockenschrank. Danach wurde die Probenlösung in Spitzkolben überführt und die TFA unter Vakuum abgezogen. Die Trockensubstanz wurde in 0.1 ml 1 M Ammoniak gelöst und mit 1 ml einer NaBH_4 Lösung (2 % in DMSO) versetzt. Die Reduktion erfolgte für 90 min bei 40°C im Wasserbad. Anschließend wurden die reduzierten Zucker durch Zugabe von 2 ml Essigsäureanhydrid und 0.2 ml 1-Methylimidazol acetyliert. Nach 15 min wurde der Rest Essigsäureanhydrid durch Zugabe von Eiswasser hydrolysiert und die Alditolacetate mit Dichlormethan ausgeschüttelt.

2.2.2. Synthese ^3H -markierter Dihydrobenzophenanthridinalkaloide

Die oxidierten Benzophenanthridinalkaloide können mit NaBH_4 reduziert werden. Bei Einsatz von NaB^3H_4 für die Reduktion entstehen in Position 8 radioaktiv markierte Dihydroverbindungen, die als Detektorsubstrate für den Enzymtest verwendet wurden. Da zur

Trennung der Dihydroverbindungen dünnschichtchromatographische Methoden zur Verfügung standen, wurden die Alkaloide Sanguinarin, Chelirubin, Macarpin und Chelerythrin in einem gemeinsamen Reaktionsansatz umgesetzt. Hierzu wurden je 10 mg der Ausgangssubstanzen in insgesamt 5 ml frisch destilliertem MeOH gelöst. Im Eis wurde nun NaB^3H_4 zugesetzt. Die eingesetzte Radioaktivität betrug 923 MBq (25 mCi); die eingesetzte Substanzmenge 88.8 μmol ; die spezifische Aktivität betrug demnach 10.4 MBq/ μmol . Nach 40 minütiger Reaktion im Eisbad erfolgte die Weiterreaktion für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde das Volumen des Reaktionsansatzes durch vorsichtiges Anblasen mit $\text{N}_2(\text{g})$ etwa um die Hälfte verkleinert. Es erfolgte nun eine Reinigung der entstandenen Dihydroverbindungen über TLC zunächst in Lf2. Die Detektion der Dihydroverbindungen erfolgte durch Auftragen von Referenzsubstanzen und Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm mit dem TLC-Radioaktivitätsscanner (R_f Werte siehe Kapitel III. 1.3.). Nach Detektion wurden die Dihydroverbindungen mit MeOH von der TLC-Platte eluiert. Die Substanzen Chelerythrin und Chelirubin wurden hierbei nur unvollständig voneinander getrennt und deshalb wie beschrieben in Lf3 rechromatographiert. Die Substanzen wurden nach der chromatographischen Reinigung in einem Gesamtvolumen von 5 ml MeOH gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Nach der endgültigen chromatographischen Reinigung der Substanzen ergab sich eine Radioaktivitätsausbeute von 15 % (138.45 MBq / 3.7 mCi). Im einzelnen wurden erhalten: Dihydrosanguinarin 39.2 MBq (1.0 mCi / 3.76 μmol); Dihydrochelirubin 17.4 MBq (0.47 mCi / 1.6 μmol); Dihydromacarpin 35.5 MBq (0.96 mCi / 3.4 μmol); Dihydrochelerythrin 42.5 MBq (1.15 mCi / 4.1 μmol).

2.3. Enzymtestverfahren

2.3.1. (S)-Norlaudanosolin-Synthase

Das Enzym Norlaudanosolin-Synthase wurde über den Umsatz eines radioaktiv markierten Substrates nachgewiesen. Der Enzymtest enthielt: 20 μ l 2,6-³H-Dopamin (57000 dpm / 1.32 GBq/mmol); 10 μ l Dopamin (10 mM); 30 μ l Dihydroxyphenylacetaldehyd oder para-Hydroxyphenylacetaldehyd (25 mM); 20 μ l Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 7.5); 10 μ l Ascorbatlösung (1 M); mit H₂O bzw. Enzymlösung wurde das Gesamtvolumen des Testansatzes auf 250 μ l ergänzt. Weil die Kondensationsreaktion des Dopamin mit dem Dihydroxyphenylacetaldehyd auch unkatalysiert abläuft, wurde die Reaktion durch Zugabe des zweiten Substrats gestartet. Die Inkubationstemperatur betrug 37° C, die Inkubationszeit 45 min. Der Test wurde durch Zugabe von 300 μ l einer Aktivkohlesuspension abgestoppt. Nach 1 Minute intensiven Schüttelns (Schüttelgerät der Firma Eppendorf) wurde die Kohle durch Abzentrifugieren in einer Tischzentrifuge aus dem Testansatz entfernt. Aus der im Überstand gemessenen Radioaktivität wurde der Umsatz errechnet. Da bei der Kondensationsreaktion nur maximal eine der beiden radioaktiven Markierungen des Moleküls ins Medium entlassen werden konnte, entsprach die Hälfte der in den Test eingesetzten Radioaktivität einem 100 prozentigen Umsatz.

2.3.2. S-Adenosylmethionin:(R,S)-Norretikulin-N-Methyltransferase

Das Enzymtestverfahren wurde nach WAT et al. 1985 durchgeführt. Der Enzymtestansatz enthielt: 20 μ l Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 7.5); 10 μ l (S)-Adeno-

sylmethioninlösung (1 mM); 10 μ l (S)-Adenosyl-L-(C^3H_3)-methionin (35000 dpm; 2.89 GBq/mmol); (R)-Norretikulinlösung 10 μ l (5 mM). Mit Enzymlösung bzw. Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 150 μ l ergänzt. Die Reaktionstemperatur betrug 37° C; die Inkubationsdauer betrug 45 Minuten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 μ l Isoamylalkohol beendet. Das gebildete Produkt wurde durch 15 minütiges Schütteln, durch Extraktion aus dem wäßrigen Enzymtestansatz entfernt. Eine Phasentrennung wurde durch kurzes Zentrifugieren erreicht. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Radioaktivität in einem Aliquot der Isoamylalkoholphase. Aus der gemessenen Radioaktivität wurde der Umsatz berechnet.

2.3.3. Berberin-Brücken-Enzym (BBE)

Der Test wurde nach der von STEFFENS 1984 beschriebenen Methode durchgeführt. Der Testansatz enthielt: 30 μ l Glycin/NaOH Puffer (1 M, pH 9.0); 5 μ l (S)-Retikulin (1 mM); 5 μ l (S)-(NC 3H_3)-Retikulin (57000 dpm; 6.64 GBq/mmol); das Testvolumen wurde mit Wasser bzw. Enzymlösung zu 150 μ l ergänzt. Die Inkubationsdauer betrug 45 Minuten; die Inkubationstemperatur betrug 37° C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 μ l Kohlesuspension gestoppt. Es wurde für 1 Minute geschüttelt. Nach Entfernen der Kohle durch 5 minütige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge wurde aus der im Überstand bestimmten Radioaktivität der Umsatz errechnet. Die maximal ins Medium entlassene Radioaktivität betrug 1/3 der eingesetzten Radioaktivität.

2.3.4. (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase (STOX)

Der Test wurde nach der von AMANN 1986 beschriebenen Methode durchgeführt. Der Testansatz enthielt 10 µl (S)-Scoulerinlösung (0.5 mM); 50 µl (R,S)-(8,14-³H₂)-Scoulerin (57000 dpm; 12.2 GBq/mmol); 20 µl Boratpuffer (1 M, pH 8.9). Mit Wasser oder Enzymlösung wurde auf ein Gesamtvolumen von 190 µl ergänzt. Die Inkubationsdauer betrug 45 Minuten; die Reaktionstemperatur war 37° C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 µl Aktivkohlesuspension (4 g Kohle + 400 mg Dextran in 100 ml Wasser) beendet. Nach Abzentrifugieren der Kohle wurde die Radioaktivität im Überstand bestimmt und daraus der Umsatz berechnet. Da ein racemisches Scouleringemisch eingesetzt wurde, kann bei 100 % Umsatz maximal die Hälfte der eingesetzten Radioaktivität freigesetzt werden.

2.3.5.(S)-Adenosylmethionin:(S)-7,8,13.14-Tetrahydroberberin-N-Methyltransferase

Der hier beschriebene Enzymtest wurde am Institut von Frau Dr. Ruffer entwickelt (RUFFER und ZENK 1986). Der Enzymtestansatz enthielt 10 µl einer 1 mM Canadinlösung (Canadin = Tetrahydroberberin), 10 µl einer 0.2 mM (S)-Adenosylmethioninlösung, 20 µl Glycin/NaOH Puffer (1 M, pH 8.0) und 10 µl einer Lösung von tritiiertem (S)-Adenosylmethionin (35000 dpm; 2.89 GBq/mmol). Mit Wasser bzw. Enzymlösung wurde auf ein Gesamtvolumen von 250 µl ergänzt. Die Inkubationstemperatur betrug 37° C; die Reaktionsdauer betrug 45 Minuten. Die Reaktion wurde auch hier durch Zugabe von 400 µl Isoamylalkohol beendet. Es erfolgte eine 15 minütige Extraktion des gebildeten Produktes in den Alkohol. Eine Phasentrennung wurde anschließend durch kurze Zentrifugation erreicht. In einem Aliquot

wurde die Radioaktivität bestimmt. Hieraus konnte der Umsatz errechnet werden.

2.3.6. Dihydromacarpin-Oxidase

Der Enzymtest für dieses Enzym wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Zusammengegeben wurden 20 μ l Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 7,0), 20 μ l Dihydromacarpinlösung (0.5 mM) und 20 μ l einer Lösung von 8-³H-Dihydromacarpinlösung (57000 dpm; 10.4 GBq/mmol). Mit Wasser bzw. Enzymlösung wurde auf ein Gesamtvolumen von 250 μ l ergänzt. Die Inkubationsdauer betrug 45 Minuten; die Reaktionstemperatur betrug 37° C. Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 300 μ l Aktivkohlesuspension (4 g Aktivkohle + 400 mg Dextran in 100 ml Wasser) wurden die Proben für 1 Minute geschüttelt und 5 Minuten lang zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge). Die Radioaktivität des Überstandes wurde anschließend bestimmt und daraus der Umsatz berechnet.

2.4. Methoden zur Proteinbestimmung

Im einfachsten Fall wurde der Proteingehalt z.B. von Säuleneluaten durch Messen der Aromatenabsorption bei 280 nm bestimmt. Für exaktere Messungen wurde die Methode von BRADFORD (1976) benutzt. Für die Bestimmung von Proteingehalten zur Berechnung von Enzymaktivitäten wurde nach der Methode von LOWRY (1951) in der von BENSADOUN et al. (1976) modifizierten Weise verfahren. Bei hochreinen Enzymlösungen wurde, wegen des geringen Proteingehaltes und um Verluste an Enzymaktivität zu vermeiden, zumeist die photometrische Warburg-Christians-Methode verwendet (LAYNE 1957).

2.5. Methoden zur Bestimmung des Zuckergehaltes

Bei verschiedenen Experimenten wurde der Zuckergehalt des Kulturmediums von Zellkulturen bestimmt. Dies, sowie die Bestimmung des Zuckergehaltes von verschiedenen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation, geschah in jedem Fall refraktometrisch mit Saccharose als Referenzsubstanz. Für die Bestimmung des Zuckergehaltes verschiedener Pilzzellwand- und Elicitorpräparate wurde die Anthronmethode verwendet. Zur Herstellung des Anthronreagenzes wurden 250 mg Anthron in 250 ml H_2SO_4 gelöst. Zur Durchführung des Test wurden zu 1 ml des Anthronreagenzes 500 μ l der zu testenden Lösung gegeben. Nach kräftigem Umschütteln wurde nach 10 Minuten die Extinktion bei 540 nm gemessen. Aus dem Vergleich mit einer Eichsubstanz wurde der Zuckergehalt bestimmt. Als Eichsubstanz wurde Glucose verwendet.

2.6. Zellaufschluß zum Nachweis von Enzymaktivität in einem Saccharose-Dichtegradienten.

Zur ultrastrukturellen Lokalisation von Enzymaktivitäten wurde die Methode der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation angewandt. Der hierbei eingesetzte Rohextrakt wurde folgendermaßen gewonnen: Zellen von Stamm W wurden durch Vakuumfiltration vom Medium getrennt. Sie wurden, um die Komponenten der Zellfeinstruktur nicht zu zerstören, sogleich in einer Reibschale mit der doppelten Menge eines Aufschlußpuffers nach BREIDENBACH und BEEVERS (1967) versetzt (2 ml/g frische Zellen). Danach wurden die Zellen durch vorsichtiges 20 minütiges Rühren mit einem Pistill aufgeschloßen. Dies geschah unter Kühlung im Eisbad. Danach wurden grobe Zelltrümmer durch

8 Lagen Mull vorsichtig abfiltriert. Der angesprochene Aufschlußpuffer enthielt: Tricin (150 mM), Saccharose (500 mM), KCl (10 mM), $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (1 mM), Na_2EDTA (1 mM), Thioglycolsäure (5 mM).

2.7. Elektronenmikroskopische Methoden

Alle Methoden, die bei der Elektronenmikroskopie durchgeführt worden sind, werden ausführlich im Ergebnisteil beschrieben. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. G. Wanner, Botanisches Institut der Universität München, durchgeführt.

III. Ergebnisse

1. Analyse des Alkaloidgehaltes der Zellkulturen und seine Veränderung nach Pilzinfektionen

1.1. Variante Stämme aus Zellkulturen von Eschscholtzia californica

Das Auftreten varianter Zellen in Kallus- oder Suspensionskulturen von Pflanzen ist ein häufig beobachtetes und gut dokumentiertes Phänomen (TABATA 1977, ZENK 1978, STABA 1982). Eine solche Varianz wurde häufig genutzt, um durch verschiedene Methoden der Selektion, Zellstämme mit überdurchschnittlich hoher Alkaloidproduktion zu gewinnen (ZENK et al. 1977, WEILER 1977, DEUS 1980, ZENK und DEUS 1982).

Auch bei der Anlage von Zellkulturen der Pflanze Eschscholtzia californica, damals noch am Institut für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum, war eine sehr starke Varianz einzelner Zellen beobachtet worden. Sie betraf das Auftreten von verschiedenfarbiger Fluoreszenz in einzelnen Zellen und wird durch eine damals von DEUS (1980) mit Fluoreszenzanregung gemachte, mikroskopische Aufnahme eindrucksvoll dokumentiert (Abb. 1). Unter Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie wurde von DEUS (1980) damals mit der Selektion einzelner Zellen nach Fluoreszenzfarben begonnen. Mittels dieser Technik wurden zwei Stämme aus Zellkulturen von Eschscholtzia californica angelegt. Die Selektion fand zunächst auf der Ebene der Kalluskultur statt. Aus den so gewonnenen Stämmen wurden Suspensionskulturen angelegt, die die charakteristischen Farben der Kalluskulturen beibehielten (DEUS 1980). In der Folgezeit wurde die Zahl der varianten Stämme aus Kulturen dieser Pflanze durch

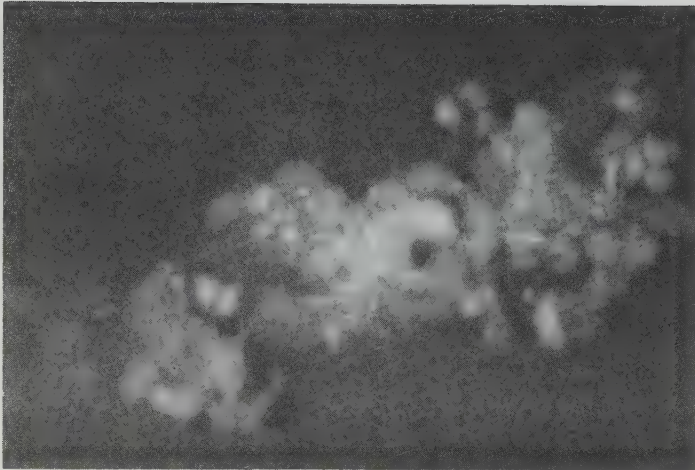


Abb. 1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von unselektionierten Zellen einer Kalluskultur von Eschscholtzia californica.

weitere Selektion nach gleichen Kriterien auf vier erhöht. Bei Beginn der vorliegenden Arbeit war die Selektion und Anlage der Stämme abgeschlossen. Sie wurden sowohl als Kallus- wie auch als Suspensionskulturen routinemäßig im Zellkulturlabor des Instituts erhalten.

Die äußere Erscheinung der Stämme kann folgendermaßen beschrieben werden:

- Stamm TR : Tiefröte Farbe und rote Fluoreszenz
- Stamm R : Leicht röte Farbe und rote Fluoreszenz
- Stamm G : Grünliche Farbe und grünlich/bläue Fluoreszenz
- Stamm W : Farblos und hellbläue Fluoreszenz.

1.2. Farbliche Veränderungen bei Stamm W einer Zellkultur von Eschscholtzia californica durch Pilzinfektionen

Beim routinemäßigen Erhalt der beschriebenen Kallus- und Suspensionskulturen traten von Zeit zu Zeit in einzelnen Kulturschälchen oder -kölbchen immer wieder Pilzinfektionen auf. Hierbei konnte vor allen Dingen beim Stamm W der Eschscholtzia Kultur eine verblüffende Beobachtung gemacht werden. Im Kontaktbereich von Pilz und Kallus bildeten die Pflanzenzellen eine rote Färbung aus (Abb. 2). Eine Braunfärbung tritt zwar normalerweise bei Kallus- und Suspensionskulturen bei Nekrose der Zellen durch Pilzbefall oder Überalterung auf; das interessante in diesem Fall war der Umstand, daß die Kultur - sowohl Kallus als auch Suspension - des Stammes W eine Farbe annahm, die der des durch Selektion entstandenen varianten Stammes TR der gleichen Pflanze sehr ähnelte. Der Gedanke lag nahe, der Pilz löse ein biosynthetisches Potential aus, das die Ganzpflanze und bestimmte Zellen einer Zellkultur (Stamm TR) noch besitzen, andere (Stamm W) aber verloren haben.

Für die weitere Untersuchung des Phänomens war es vor allem wichtig festzustellen, ob es sich bei der Rotfärbung nicht etwa um einen Farbstoff handelte, der durch den Pilz gebildet wurde. Sollte die Rotfärbung tatsächlich auf einer Syntheseleistung der Pflanzenzellen beruhen, war es wichtig herauszufinden, ob nur der lebende Pilz in der Lage war diese Syntheseleistung auszulösen, oder ob, wie im Fall von Elicitoren der Phytoalexinbildung, schon Bestandteile, zum Beispiel Zellwandfraktionen der Pilze, genauso wirken können. Beide Fragen ließen sich einfach beantworten, wenn es gelänge, mit durch Autoklavieren abgetöteter Pilzmasse, die Rotfärbung bei den Kulturen auszulösen. Hierzu wurden zunächst Pilze von den

E.californica Kallus Kultur

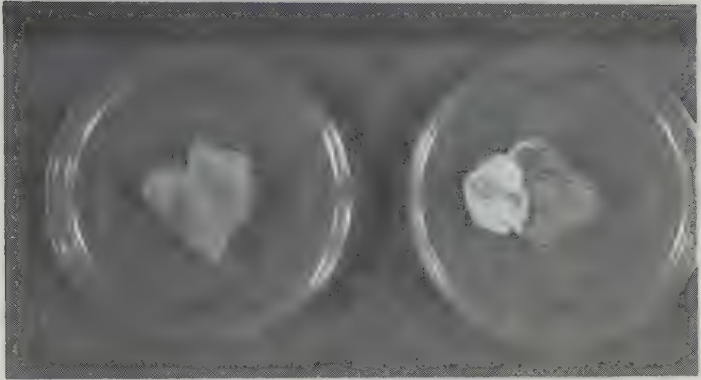


Abb. 2 Gezeigt ist eine normale Kalluskultur von Eschscholtzia californica Stamm W und eine gleichartige Kalluskultur bei Kontamination mit dem Pilz P 1. Im Kontaktbereich von Kallus- und Pilzkultur ist eine Rotfärbung des Pflanzengewebes zu sehen.

E.californica Callus Culture

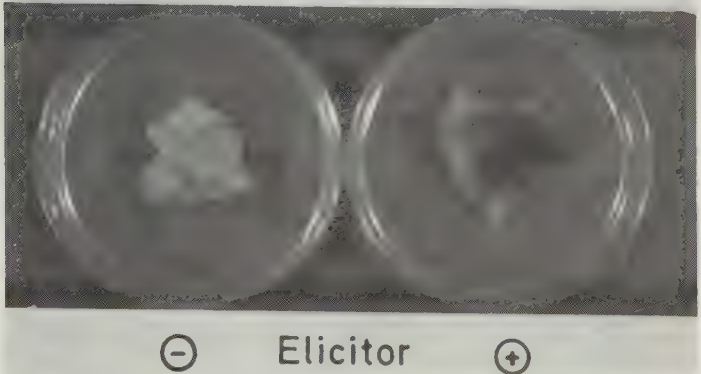


Abb. 3 Die Abbildung zeigt zum einen eine normale Kalluskultur von Eschscholtzia californica Stamm W (- Elicitor) und eine gleichartige Kalluskultur 4 Tage nach Aufbringen von autoklaviertem Pilzmycel (+ Elicitor).

Infektionsherden des Kallus abgeimpft und kultiviert. Erleichtert wurde die Arbeit durch den günstigen Umstand, daß es gelang, die von den Zellkulturen abgeimpften Pilze auf dem gleichen, mit Agar verfestigten LS-Medium anzuziehen, auf dem auch die Pflanzenkalli wuchsen. Hierdurch war sichergestellt, daß nicht in etwa verwendeten Pilzmedien mögliche andere Elicitoren den gleichen Effekt hätten vortäuschen können. Wie schon angedeutet, handelte es sich bei der beobachteten Kontamination der Zellkultur nicht um die Infektion mit einem homogenen Pilz; aus der Mischkultur konnten im Laufe der Zeit drei homogene Pilzkulturen isoliert werden, die mit P1, P2 und P3 bezeichnet wurden.

Zunächst wurde aber eine größere Menge der Mischkultur auf Petrischalen angezogen. Ungefähr 500 mg Pilzzellen (Hyphen sowie bereits gebildete Fruchtkörper) wurden dann 25 min bei 1 bar und 120 °C autoklaviert. Anschließend wurden die auf diese Weise abgetöteten Pilzzellen auf eine Kalluskultur des Stammes W aufgebracht. Abbildung 3 zeigt deutlich, daß auch die aufgebrachte tote Pilzmasse eine Rotfärbung des Pflanzenkallus auslöst. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß die Verfärbung des Pflanzenkallus durch irgendeine aktive Stoffwechselleistung des Pilzes herbeigeführt wird. Gleichzeitig schien es angebracht, die wie beschrieben gewonnene Pilzmasse zumindest als einen "Rohelicitor" anzusprechen. Ein auf die gleiche Weise gewonnener Rohelicitor löste bei Eintrag in eine Suspensionskultur des gleichen Stammes dort ebenfalls eine Rotfärbung aus (siehe Abb. 4).

1.3. Qualitative Analyse der Inhaltsstoffe der Zellkulturen von Eschscholtzia californica

Die gemachten Beobachtungen ließen eine genauere

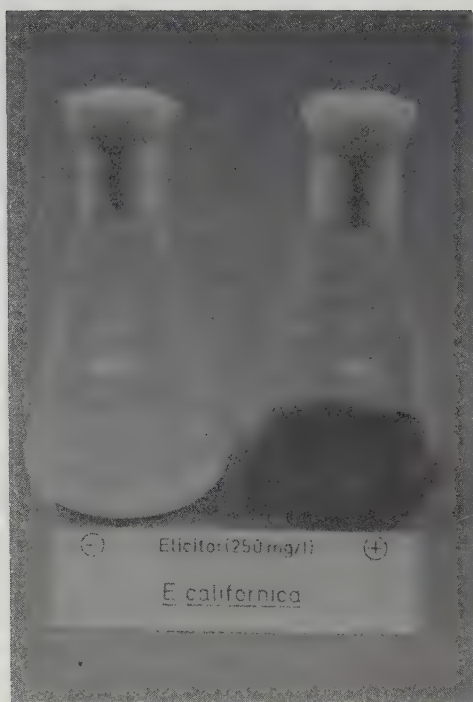


Abb. 4 Abgebildet ist eine Suspensionskultur von Eschscholtzia californica Stamm W

qualitative Analyse der Inhaltsstoffe der Zellkulturen notwendig erscheinen. Schon 1980 war von DEUS in einem der Stämme das Alkaloid Protopin nachgewiesen worden. Genauere Untersuchungen über die Inhaltsstoffe der Ganzpflanze waren in den fünfziger Jahren von SLAVIK und SLAVIKOVA (1955b) vorgenommen worden. Hierbei waren neben den Alkaloiden Protopin und Allocryptopin vor allem Alkaloide vom Typ der Benzopheanthridine isoliert worden (SLAVIK und SLAVIKOVA 1955b). Dabei entdeckten sie zwei neue Alkaloide, denen sie die Namen Chelirubin und Chelilutin gaben (SLAVIK und SLAVIKOVA 1955a). Im gleichen Jahr veröffentlichten die gleichen Autoren auch die Isolation

des Alkaloids Macarpin. Die von ihnen gemachten Strukturvorschläge (SLAVIK et al. 1968) erwiesen sich allerdings als falsch. Die Struktur des Chelirubins wurde später von ISHII et al. (1975), die des Macarpins erst endgültig 1981 von TAKAO et al. aufgeklärt. Seit längerem waren solche Benzophenanthridinalkaloide auch schon in Zellkulturen nachgewiesen worden (IKUTA et al. 1974, TAKAO et al. 1981 und 1983). Zuletzt hatten BERLIN et al. (1983) Benzophenanthridinalkaloide und deren Dihydroverbindungen in Zellkulturen von Eschscholtzia californica nachgewiesen. Da die beschriebenen Alkaloide stark gefärbt (Chelirubin und Macarpin sind dunkelrot) sind, hätte ihre Bildung eine Rotfärbung der Zellkulturen, wie sie beobachtet worden war, bewirken können. Es wurde daher zur Identifizierung der Inhaltsstoffe eine Methode gewählt, die vor allem die Isolation von Alkaloiden gestattet.

Hierzu wurden zunächst 2,5 kg Pflanzengewebe, das durch Vakuumfiltration vom Medium befreit worden war (das entspricht bei einem Trockengewicht von 4 % einem Gewebetrockengewicht von 100 g), mit 5 l MeOH extrahiert. Die Extraktion erfolgte 2 Stunden bei 60° C. Die unlöslichen Bestandteile wurden abfiltriert und noch einmal am Rückfluß 1 Stunde mit 1 l MeOH extrahiert. Die beiden methanolischen Extrakte wurden vereinigt und unter Vakuum zu einem rotbraunen Öl eingengt. Das Öl wurde 3 mal mit jeweils 300 ml 2 % Weinsteinsäure für 20 Minuten bei 50° C gewaschen. Die in Weinsteinsäure unlöslichen Bestandteile wurden abfiltriert. Die Filtration erfolgte durch Diatomeenerde. Anschließend wurde die Diatomeenerde mit Chloroform extrahiert (3 x mit jeweils 100 ml). Nach Einengen des Chloroform-Extraktes am Vakuum wurden 2 g öliger Rückstand erhalten. In diesem Rückstand konnten Benzophenanthridinalkaloide nachgewiesen werden. Weiter gereinigt wurde der Rückstand über Dün-

schichtchromatographie an Kieselgel. Hierzu wurden die Laufmittel Lf1 und Lf2 benutzt.

Durch Chromatographie in Laufmittel Lf-1 wurden folgende Substanzen gereinigt :

Substanz 1 Sanguinarin

Rf = 0.31/Lf-1, Rf = 0.68/Lf-2
MS (EI) = (Cl⁻) 332 (M⁺, 18) 317 (30) 174 (21)
147 (100) 113 (44) 110 (50.6)

Substanz 2 Chelerythrin

Rf = 0.093/Lf-1, Rf = 0.61/Lf-2
MS (EI) = (Cl⁻) 348 (M⁺, 11) 333 (100) 318 (30)
303 (13) 290 (47) 275 (40) 232 (26) 166
(30) 144 (48)

Substanz 3 Chelilutin

Rf = 0.45/Lf-1, Rf = 0.048/Lf-2
MS (EI) = (Cl⁻) 378 (M⁺, 8.5) 363 (57.2) 348 (100)
320 (25.7) 164 (37) 159 (65)

Substanz 4 Chelirubin

Rf = 0.61/Lf-1, Rf = 0.62/Lf-2
MS (EI) = (Cl⁻) 362 (M⁺, 14) 347 (91) 332 (100)
246 (71) 173 (65)

Substanz 5 Macarpin

Rf = 0.14/Lf-1, Rf = 0.53/Lf-2
MS (EI) = (Cl⁻) 392 (M⁺, 28) 377 (100) 362 (71)
348 (20) 332 (31) 277 (40) 261 (37) 189
152 (71)

Chromatographie des öligen Rückstandes in Laufmittel 2 (Lf-2) gestattete ebenfalls die Reinigung der Dihydroformen der isolierten Benzophenanthridinalkaloide. Referenzen für diese Substanzen wurden durch Reduktion der oxidierten Formen mit NaBH₄ gewonnen.

Substanz 6 Dihydrosanguinarin

Rf = 0.94/Lf-1, Rf = 0.61/Lf-3, Rf = 0.39/Lf-3
MS (EI) = 333 (M⁺, 100) 332 (80) 318 (14)

Substanz 7 Dihydrochelerythrin

Rf = 0.91/Lf-1, Rf = 0.57/Lf-2, Rf = 0.21/Lf-3
MS (EI) = 349 (M⁺, 90) 334 (100) 319 (80) 304 (15)
290 (10)

Substanz 8 Dihydrochelilutin

Rf = 0.87/Lf-1, Rf = 0.44/Lf-2, Rf = 0.14/Lf-3
MS (EI) = 379 (M⁺, 100) 364 (20) 349 (81) 334 (28)
306 (71) 168 (56)

Substanz 9 Dihydrochelirubin

Rf = 0.96/Lf-1, Rf = 0.55/Lf-2, Rf = 0.34/Lf-3
MS (EI) = 363 (M⁺, 100) 348 (58) 333 (12.5) 182
(45) 145 (50)

Substanz 10 Dihydromacarpin

Rf = 0.92/Lf-1, Rf = 0.5/Lf-2, Rf = 0.28/Lf-3
MS (EI) = 393 (81) 378 (M⁺, 100) 363 (19) 348 (23)
333 (31) 197 (54)

Die zweiprozentige Weinstein säurefraktion wurde anschließend mit NH₄OH auf einen pH-Wert von 10 eingestellt und zweimal mit je 500 ml Chloroform extrahiert. Nach Einengen unter Vakuum wurden 500 mg öli ger Rückstand erhalten. Diese Fraktion sollte ter tiäre Basen enthalten. Nach dünnschichtchromatogra phischer Reinigung dieser Fraktion in Lf-4 und Ver gleich mit Referenzalkaloiden konnten zwei Alkaloide aus dieser Fraktion isoliert werden.

Substanz 1 Protopin

Rf = 0.58/Lf-4
MS (EI) = 353 (M⁺, 5,4) 190 (20) 163
(41.8) 149 (23) 148 (100) 147
(20) 133 (14.5)

Substanz 2 -Allocryptopin

RF = 0.42/Lf-4

MS (EI) = 369 (M⁺, 5.4) 354 (9) 206 (30.9) 178
(25.5) 164 (100) 163 (29) 149 (47.2)

Die durch Ammoniakzugabe alkalisierte Weinstein-säurefraktion wurde nun mit HCl wieder angesäuert. Der Versuch aus dieser Lösung quarternäre Alkaloide als Reineckate auszufällen mißlang.

Ungewöhnlich an diesem Reinigungsschema ist, daß die oxidierten wie die reduzierten Formen der Benzophenanthridinalkaloide in der 2 % Weinsteinsäure nicht löslich sind. Zu erwarten wäre gewesen, daß die reduzierten Formen in der gleichen Fraktion wie Protopin und Allocryptopin auftreten; die oxidierten hätten als Reineckate ausgefällt werden sollen. Das gleiche Phänomen tritt auch bei einem Reinigungsgang für Benzophenanthridinalkaloide aus Macleaya microcarpa auf, den TAKAO et al. (1983) beschreiben, und kann wohl nur mit dem stark hydrophoben Charakter zumindest der reduzierten Benzophenanthridine erklärt werden.

Ungewöhnlich ist auch, daß sich ohne Anwendung besonderer technischer Verfahren mit der EI-Methode Massenspektren von den Hydrochloriden der oxidierten Benzophenanthridine messen lassen. Dies sollte nach Lehrbuchmeinung nur durch Anwendung des DCI-Verfahrens möglich sein. Die Unterscheidung von reduzierten und oxidierten Benzophenanthridinen anhand des Massenspektrums ist trotz des nur geringen Unterschiedes von einer Masseneinheit gut möglich, da oxidierte und reduzierte Verbindungen deutliche Unterschiede in der Intensität der Massenpeaks, insbesondere bei denen des Molekülions zeigen.

1.4. Quantitative Analyse von Inhaltsstoffen der varianten Zellkulturstämme und der Ganz- pflanze von Eschscholtzia californica

Für eine schnelle und quantitative Analyse der wesentlichen Inhaltsstoffe war der beschriebene Isolierungsgang zu aufwendig und zu ungenau. Die komplizierten Reinigungsschritte machten einen Substanzverlust wahrscheinlich und erschwerten die Arbeit mit kleinen Probenmengen. Darüberhinaus könnte in diesem speziellen Fall die komplizierte Aufarbeitung des Extraktes zu einer Oxidation der Dihydrobenzophenanthridine führen. Auf diese Gefahr weisen auch BERLIN et al. (1983) hin. Eine geeignete Methode zur Quantifizierung der Inhaltsstoffe ohne aufwendige Probenvorbereitung, direkt aus einem methanolischen Extrakt des zu untersuchenden Gewebes, schien die Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC / High Performance Liquid Chromatography) zu sein. Ausgewählt wurde die sogenannte Reversed-Phase HPLC. Bei dieser Methode wird mit Trennmedien gearbeitet, deren Kieselgelmatrix mit aliphatischen Gruppen unterschiedlicher Molekülkettenlänge derivatisiert ist. Das Trennmateriale erhält hierdurch einen hydrophoben Charakter. Die Trennung wird durch Anwendung von Lösungsmittelgradienten erreicht. Man wechselt dabei von einem schwachen (hydrophilen) zu einem starken (hydrophoben) Elutionsmittel. In diesem Fall wurden Gradienten zwischen Wasser und Acetonitril verwendet.

Durch Modifikation des Gradienten gelang es, ein System zu entwickeln, das die Auftrennung aller zuvor nachgewiesener Inhaltsstoffe in einfachen methanolischen Extrakten während einer Analyse gestattete. Abbildung 5 zeigt die Auftrennung der Benzophenanthridine mit dem entwickelten HPLC Verfahren.

Neben den Benzophenanthridinalkaloiden konnte mit dem beschriebenen Verfahren auch eine Reihe von Alka-

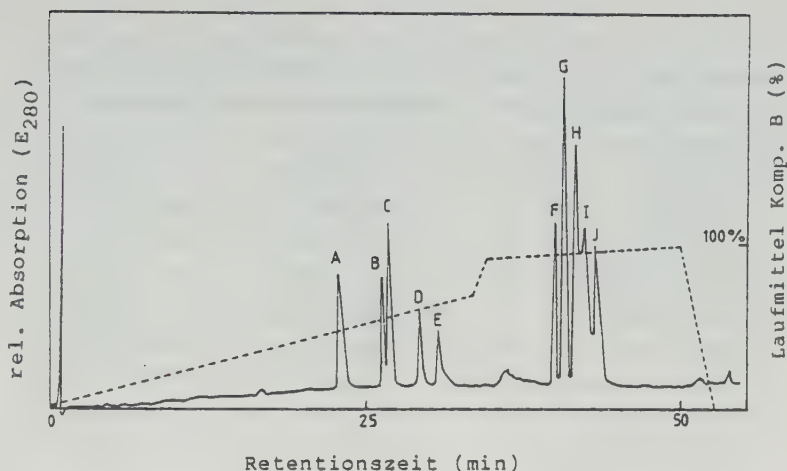


Abb. 5 Auftrennung eines Gemisches von oxidierten und reduzierten Benzophenanthridinalkaloiden mit dem entwickelten HPLC-System. A=Sanguinarin, B=Chelerythrin, C=Chelirubin, D=Chelilutin, E=Macarpin, F=Dihydrochelilutin, G=Dihydrochelerythrin, H=Dihydromacarpin, I=Dihydrochelirubin, J=Dihydrosanguinarin.

liden getrennt werden, die als mögliche biosynthetische Vorstufen der Benzophenanthridinalkaloide in Betracht kommen (BATTERSBY et al. 1965 und 1967). In Tabelle 1 sind alle Substanzen, die hier untersucht wurden, und ihre Retentionszeiten genannt.

Die Quantifizierung der Alkaloide erfolgte über die Integration der Peakflächen mit einem Integrator und Vergleich mit Referenzsubstanzen.

Zur Analyse der Inhaltsstoffe mit dieser Methode wurden die verschiedenen Zellsuspensionskulturen in 300 ml Erlenmeyerkolben angezogen und nach einer Woche Wachstum durch Vakuumfiltration geerntet. 4 g des frischen Gewebes wurden 3 mal mit je 10 ml eines Gemisches aus Ethanol / 0.1 N HCl für 1 h am

Substanz	Retentionszeit
Magnoflorin	12.9 min
Scoulerin	13.6 min
Cryptopin	16.5 min
Protopin	16.7 min
α -Allocryptopin	17.6 min
Stylopin	18.7 min
Sanguinarin	24.0 min
Chelerythrin	26.8 min
Chelirubin	28.3 min
Chelilutin	30.3 min
Macarpin	32.2 min
Dihydrochelilutin	41.4 min
Dihydrochelerythrin	42.3 min
Dihydromacarpin	42.8 min
Dihydrochelirubin	42.6 min
Dihydrosanguinarin	43.0 min

Tab. 1 Substanzen, die mit dem entwickelten HPLC-verfahren nachgewiesen werden können und ihre zugehörigen Retentionszeiten.

Rückfluß extrahiert. Die sauren Bedingungen wurden gewählt, um die Bildung von Alkoxyderivaten durch oxidierte Benzophenanthridinalkaloide zu vermeiden. Solche oft auch als Pseudobasen bezeichneten Derivate bilden sich leicht durch Anlagerung einer leichten Base an die Positin 8 des Moleküls. Die Extrakte wurden anschließend unter Vakuum auf 10 ml eingeeengt und ein Aliquot mit der HPLC-Methode analysiert. Tabelle 2 zeigt die auf diese Weise für die verschiedenen Stämme der Eschscholtzia californica Zellkultur gemessenen Alkaloidgehalte.

Auf ähnliche Weise wurde auch der Alkaloidgehalt der Ganzpflanze gemessen. Verwendet wurde eine am Institut im Frühbeet gezogene Pflanze. Die Pflanze wurde im September nach ihrer Blüte geerntet und aufgearbeitet. Wurzel, Blätter und Stengel wurden getrennt extrahiert.

In den untersuchten Blättern konnten keine Benzo-

phananthridine festgestellt werden. Die Stengel enthielten Sanguinarin in einer Menge von 0.03 % des Trockengewichts. Nennenswerte Alkaloidmengen konnten in den Wurzeln gemessen werden. Insgesamt waren 1.6 % des Wurzeltrockengewichts Benzophenanthridinalkaloide, davon 55 % Sanguinarin und 45 % Chelerythrin. Damit lagen die Gehalte der Zellkulturstämme bezogen auf das Trockengewicht unter dem der Wurzeln von Eschscholtzia californica aber deutlich über dem der krautigen Pflanzenteile. Sie waren im einzelnen: Stamm TR 0.9 % , Stamm R 0.69 % , Stamm G 0.3 % , Stamm W 0.29 % .

Alkaloid	Gehalt (mg/l Medium)				
	Stamm	TR	R	G	W
Sanguinarin		2.9	3.3	0	0
Chelerythrin		3.5	0	0.7	0
Chelilutin		0.2	0	0	0
Chelirubin		0.6	14.5	5.1	0.7
Macarpin		19.6	5.9	4.7	5.6
Dihydromacarpin		53.0	27.5	7.1	6.7
Gesamt		79.8	51.2	17.6	13.0

Tab. 2 Gehalt der varianten Stämme von Eschscholtzia californica an Benzophenanthridinalkaloiden

1.5. Untersuchung des Infektionsphänomens auf chemischer Grundlage

1.5.1. Qualitative Analyse des Infektionsphänomens

Das entwickelte Analyseverfahren bot nun die Möglichkeit, Veränderungen im Sekundärstoffgehalt der Zellkulturen als Folge einer Pilzinfektion zu verfolgen. Zunächst wurde eine qualitative Untersuchung vorgenommen. Hierzu wurden 300 ml Erlenmeyer Kolben, die 75 ml frisches Medium enthielten, mit 6 g frischen Zellen des Stammes W angeimpft. Nach vier Wuchstagen wurden zu jeweils zwei Kolben autoklaviertes Pilzmycel (250 mg) zugegeben. Zwei weitere Kolben wurden zur Kontrolle nicht behandelt. Nach vier weiteren Wuchstagen wurden die Kolben abgeerntet. 4 g frisches Gewebe (= 0.4 g Trockengewicht) wurde 3 mal mit je 10 ml wie beschrieben extrahiert. Die Extrakte wurden anschließend mit der HPLC-Methode analysiert. Die Abbildungen 6 A und 6 B zeigen die Ergebnisse der Analyse. Deutlich erkennbar ist der hohe Gehalt an Dihydromacarpin in den unbehandelten Kulturen und der hohe Macarpingehalt in den mit Pilzzellen versetzten.

Die stark rote Farbe des Macarpins machte die Anwendung eines noch schnelleren Meßverfahrens zur Ermittlung des Macarpingehalts möglich. Abbildung 6 C zeigt das in 6 B gezeigte HPLC-Profil des Pflanzenextraktes bei einer Detektionswellenlänge von 490 nm. Durch den Umstand, daß Macarpin die einzige enthaltene Substanz in nennenswerter Menge war, die im sichtbaren Bereich absorbiert, ließ sich seine Konzentration direkt optisch bestimmen. Abbildung 7 zeigt die Meßbereiche für die photometrische und die Messung des Macarpins mit HPLC. Der photometrische Nachweis erfolgte in der Regel mit Hilfe eines Photometers der Firma Dynatech Microplate Reader MR 600.

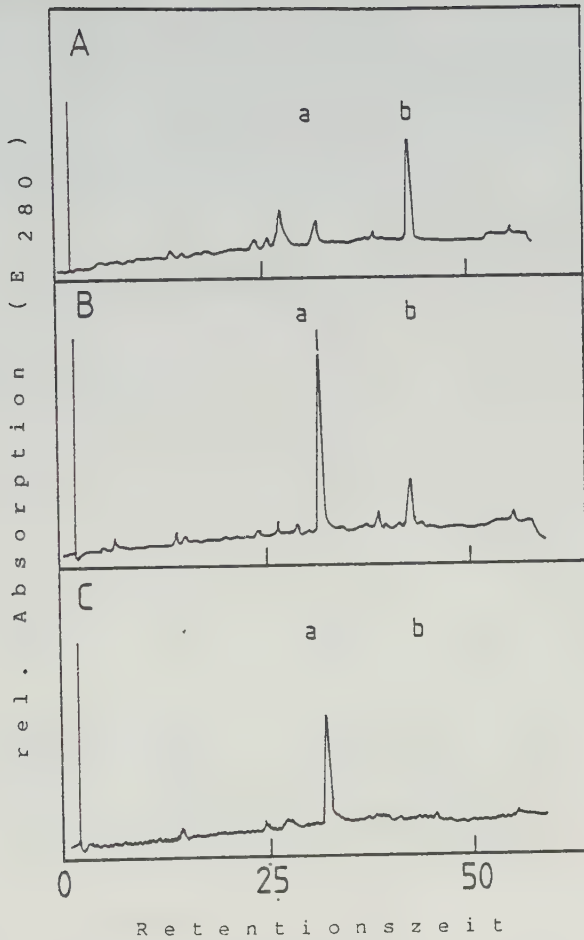


Abb. 6 HPLC-Profile von Pflanzenextrakten einer Zellkultur von *Eschscholtzia californica* Stamm W. A. HPLC-Profil eines Extraktes einer unbehandelten Zellkultur, B. HPLC-Profil des Extraktes einer Zellkultur zwei Tage nach Zugabe von 250 mg autoklaviertem Pilzmycel pro 75 ml Medium, C. HPLC-Profil des gleichen Extraktes wie bei Abb.6 B mit Detektion bei 490 nm. a. Macarpin, b. Dihydromacarpin

Hierbei wurden genau 250 µl einer Standardlösung je Napf in einer Mikrotiterplatte (Firma Greiner, F Form) gemessen. Gegenüber einer photometrischen Standardmessung (10 mm Schichtdicke einer Standardküvette / Zeiss-Photometer) war hierbei ein Korrekturfaktor von $\times 2.61$ zu berücksichtigen. Die Messungen erfolgten wie die Gewebeextraktionen jeweils in EtOH/HCl (0.1N) = 80/20.

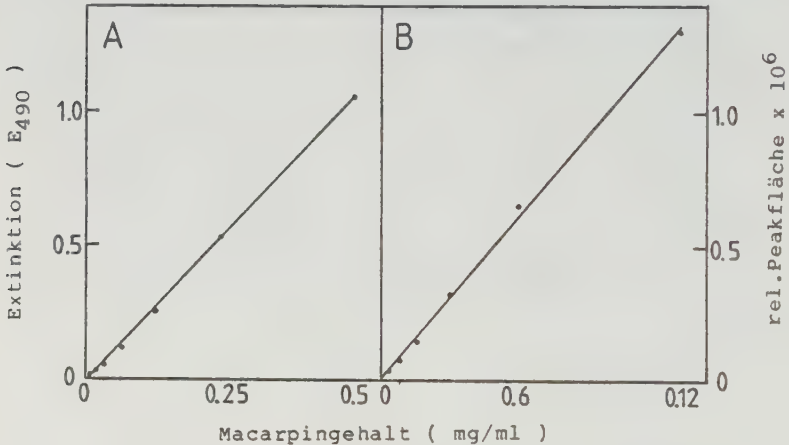


Abb. 7 Vergleich der Meßbereiche für die verschiedenen Methoden zur quantitativen Bestimmung von Macarpin. A. Messung der Extinktion bei 490 nm mit dem Dynatech Photometer, B. Messung des Macarpingehalts durch Peakflächenintegration mit der HPLC.

Mit den geschilderten schnellen Detektionsverfahren für den Benzophenanthridingehalt standen nun geeignete Methoden für weitergehende physiologische Experimente zur Verfügung.

1.5.2. Bäckerhefe als "Elicitor"-Rohsubstanz

Für eine weitere Untersuchung erwies sich allerdings das verwendete Pilzmaterial als ungünstig. Es

stand zum damaligen Zeitpunkt nur die beschriebene Mischkultur zur Verfügung und noch kein definiertes Material. Außerdem war die Gewinnung des Materials zeitraubend und mühsam. Bei der Suche nach einer geeigneteren Rohsubstanz zeigte sich, daß auch gewöhnliche Bäckerhefe die Rotfärbung des Gewebes auslöste. Der bekannten Literatur über Elicitoren der Phytoalexinbildung folgend, kamen Enzyme (LEE und WEST 1978, DAVIS et al. 1984) oder Zellwandbestandteile (SHARP et al. 1984, JIN und WEST 1984) der Pilze als Auslöser der Abwehrreaktion in Betracht. Im Falle der autoklavierten Bäckerhefe konnten Enzyme als Ursache der Macarpinbildung in Zellkulturen wohl ausgeschlossen werden. Der thermostabile Charakter der Substanz legte den Gedanken an eine Zuckerkomponente oder ein Peptid nahe. Eine übliche Methode zur Anreicherung polymerer Zucker aus wäßrigen Lösungen ist die Ethanolfällung. Mit der Arbeitshypothese, es handle sich bei der die Rotfärbung auslösende Komponente um eine Zuckerkomponente aus der Hefezellwand, wurde einer Arbeitsvorschrift von KOCOUREK und BALLOU (1969) gefolgt. Hierzu wurden 1 kg Hefe in 1.5 l NaCitrat Puffer (20 mM, pH 7.5) gelöst und 60 Minuten lang autoklaviert. Durch diesen Prozeß sollen vorwiegend Mannane aus der Hefezellwand gelöst werden. Anschließend wurde 20 min bei 10 000 g zentrifugiert. Danach erfolgte die Ausfällung der Zucker aus dem abdekantierten Überstand durch Zugabe des doppelten Volumens Ethanol. Nach Rühren über Nacht wurden am nächsten Morgen die ausgefallenen Bestandteile bei 10 000 g (20 min) abzentrifugiert. Das so erhaltene Präparat löste nach Gefriertrocknung ebenfalls eine Rotfärbung der Zellkulturen aus. Hierbei übertraf das Hefepräparat noch den Effekt der bisher verwendeten Pilze. Mit dem so erhaltenen Präparat wurden die meisten der beschriebenen Tests durchgeführt. Es wird im folgenden als "Hefeelictor" bezeichnet

1.5.3. Quantitative Analyse der induzierten Alkaloidbildung

Mit dem aus Hefe durch Ethanol-fällung gewonnenen Elicitorpräparat wurde die Induktion der Alkaloidbildung bei allen varianten Stämmen der Eschscholtzia californica Zellkultur quantitativ verfolgt. Die Anzucht des Gewebes erfolgte, wie schon beschrieben, in 300 ml Erlenmeyerkolben (75 ml Medium). Von jedem Stamm wurden 8 Kolben angelegt (Inoculum = 4 g frisches Gewebe). Nach 4 Wuchstagen wurde zu 4 der Kolben jeweils 40 mg des mit Ethanol ausgefällten Hefepräparates zugegeben; zwei unbehandelte Kolben wurden durch Vakuumfiltration geerntet und extrahiert. Die Inhaltsstoffe der geernteten Zellen wurden analysiert (Abb. 8 A). Nach zwei Tagen wurden zwei mit Hefeelicitor versetzte (Abb. 8 B)und zur Kontrolle ein unbehandelter Kolben extrahiert. Nach zwei weiteren Tagen wurde ebenso verfahren (Abb. 8 C). Während in dem Zeitraum von 4 Tagen die Menge und die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe in den Kontrollkolben konstant blieb, zeigt Abb. 8 die Veränderungen in den mit Elicitor versetzten Kulturen. Zunächst zeigte sich eine Abnahme des Dihydromacarpins und eine Zunahme der oxidierten Benzophenanthridinalkaloide. Daneben kam es aber auch zu einer Steigerung des Gesamtbenzophenanthridingehaltes. Der rot gefärbte Stamm TR zeigte nach Zugabe des Hefepräparates die gleiche Reaktion wie die Stämme mit geringerem Alkaloidgehalt. Bei diesem Stamm fiel die Reaktion sogar besonders deutlich aus. Allerdings ließ sich in diesem Fall die Reaktion mit dem Auge nur schwer beobachten.

Bei diesem Versuch erfolgte die quantitative Bestimmung der Alkaloide nicht nur durch HPLC, sondern auch mit dem geschilderten Schnelltestverfahren. Tabelle 3 zeigt einen Vergleich der beiden Methoden.

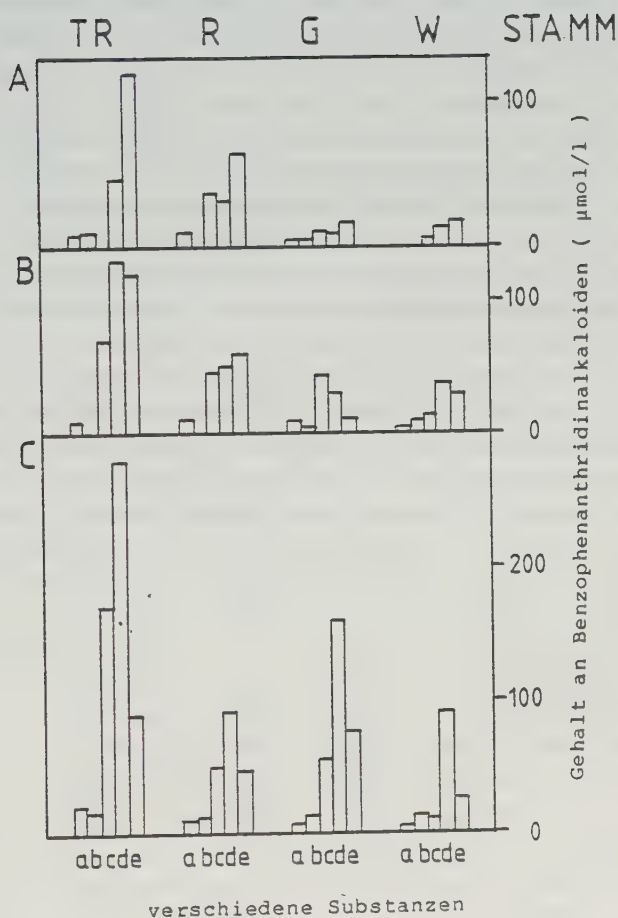


Abb. 8 Gehalte verschiedener Stämme einer Zellkultur von *Eschscholtzia californica* an Benzophenanthridinalkaloiden A. ohne Zusatz von Hefeelicitator nach 8 Wuchstagen, B. mit Zusatz von Hefeelicitator zum Medium (500 mg/l) nach 6 Wuchstagen und zwei Tage nach Elicitorzusatz, C. mit Zusatz von Hefeelicitator zum Medium (500 mg/ml) nach 6 Wuchstagen und 4 Tage nach Elicitorzusatz. a. Sanguinarin, b. Chelerythrin, c. Chelirubin, d. Macarpin, e. Dihydroverbindungen (nicht genau bestimmt aber zu mind. 80 % Dihydropmacarpin)

Verglichen sind hierbei nur die Meßwerte für die oxidierten Alkaloide. Die reduzierten Verbindungen werden durch das optische Verfahren nicht erfaßt. Der Fehler bei den beiden Methoden bezogen auf den Gesamtalkaloidgehalt ist also größer als der angegebene Fehler für die oxidierten Benzophenanthridinalkaloide. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, ist für den Fall der oxidierten Benzophenanthridine die größte auftretende Abweichung zwischen den Testverfahren 6.3 %. Die mittlere Abweichung der Testverfahren beträgt 3 %. Der kleine Fehler rechtfertigt die Bestimmung des

Gehalt an oxid.Benzophenanthridinen (mg/l)				
Verfahren		HPLC	opt.Test	% Fehler
Stamm TR	A	26.8	27.4	2.1
	B	90.4	94.1	4.2
	C	194.0	197.0	1.5
Stamm R	A	23.4	24.1	4.2
	B	40.1	41.6	3.5
	C	48.7	50.2	2.8
Stamm G	A	3.9	4.1	4.6
	B	29.0	30.9	6.3
	C	92.2	94.9	2.7
Stamm W	A	2.4	2.5	0.8
	B	21.4	22.0	2.7
	C	46.4	47.8	2.9

Tab. 3 Gehalte an Benzophenanthridinalkaloiden verschiedener Stämme von *Eschscholtzia californica* gemessen mit HPLC durch Peakflächenintegration und optisch durch Messung der Extinktion bei 490 nm. A. ohne Elicitorzugabe, B. 2 Tage nach Elicitorzugabe, C. 4 Tage nach Elicitorzugabe

Gehalts der Zellkulturen an oxidierten Benzophenanthridinen durch das schnellere optische Testverfahren.

2. Entwicklung eines Testverfahrens zur Ermittlung der Aktivität von Elicitorpräparaten

Die bisher geschilderten Methoden gestatteten eine schnelle Bestimmung oxidierter Benzophenanthridinalkaloide in den Zellkulturen. Damit konnte die Reaktion der Zellkulturen auf Zugabe von Elicitoren zum Kulturmedium quantitativ gut verfolgt werden. Verschiedene Autoren berichten über die Abhängigkeit der Phytoalexinproduktion von der im jeweiligen Testsystem applizierten Menge des Elicitors (AYERS et al. 1976, EBEL et al. 1976, WEST 1981). Eine solche Abhängigkeit ist für die weitere Arbeit wichtig. Wenn die Zellkultur bei Zugabe verschiedener Mengen des Elicitors oder verschiedener Elicitoren mit einer mehr oder weniger starken Alkaloidbildung reagiert, kann die Höhe der Alkaloidproduktion als ein Maßstab für die Elicitoraktivität angesehen werden. Ein stärker gereinigter Elicitor sollte dann bei Zugabe gleicher Substanzmengen eine höhere Alkaloidbildung auslösen als der weniger reine Ausgangselicitor. Für die nun folgenden Untersuchungen wurde immer Stamm W der Eschscholtzia californica Zellkultur herangezogen.

Zunächst wurde ein Testsystem ausgearbeitet bei dem die Zellkultur in 300 ml Erlenmeyerkolben angezogen wurde. Bei Zellkulturen ist das physiologische Potential häufig von ihrem Wuchsstadium abhängig. Um ein möglichst sensitives Testsystem auf Elicitoraktivität zu erreichen, sollte zunächst festgestellt werden, in welchem Wuchsstadium die verwendete Kultur auf die Zugabe von Elicitor am stärksten mit vermehr-

ter Alkaloidbildung reagiert. Hierzu wurde eine Anzahl von 300 ml Erlenmeyerkolben, die 75 ml Medium enthielten, mit 4 g Inoculum frischer Zellen von Stamm W angeimpft. Nach jeweils 2 Tagen wurden je 2 Kolben abgeerntet und das Trockengewicht der Kultur sowie der Gehalt der Kultur an oxidierten Benzophenanthridinen durch Messen der Extinktion bei 490 nm bestimmt. Nach 6 Wuchstagen wurden je 2 weitere Kolben mit 20 mg eines durch Ethanol-fällung gewonnenen Hefeelicitors versetzt. 48 Stunden später wurden diese Kolben gemeinsam mit den nicht mit Elicitor versetzten Kolben geerntet. Auch hier wurde Trockengewicht und Alkaloidgehalt bestimmt. Abbildung 9 zeigt die Wuchskurve. Es wird deutlich, daß die Zugabe des Elicitors zu einer Kultur in der logarithmischen Wuchsphase die stärkste Alkaloidbildung auslöst.

Für die folgenden Versuche wurden die Kolben mit 4 g Inoculum angeimpft. Nach 10 Wuchstagen erfolgte die Zugabe unterschiedlicher Elicitormengen die jeweils in 4 ml LS-Medium gelöst waren. Nach Lösen des Elicitors wurde das Medium noch einmal autoklaviert, um eine Kontamination mit nativen Pilzen zu vermeiden. Die so behandelten Kulturen wuchsen danach noch 48 Stunden. Anschließend wurden sie durch Vakuumfiltration geerntet. Extrahiert wurden jeweils 4 g frisches Zellmaterial (Trockengewicht der Kultur = 11 g/l) mit 30 ml EtOH:HCl(0.1N)/80:20. Die Extraktion erfolgte in verschlossenen 100 ml Erlenmeyerkolben für 2 h bei 60 °C. Der Gehalt der Suspensionszellen an oxidierten Benzophenanthridinen wurde durch Messen der Extinktion bei 490 nm bestimmt.

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die Versuchsergebnisse zum einen für rohe autoklavierte Bäckerhefe, zum anderen für das durch Ethanol-fällung angereicherte Elicitorpräparat. Die Bildung der Benzophenanthridine ist deutlich abhängig von der Menge an einge-

setztem Elicitor. Im Bereich hoher Elicitorkonzentrationen nähert sich die Kurve asymptotisch einer sozusagen maximalen Alkaloidproduktion, die auch durch Zugabe von mehr Elicitor nicht mehr gesteigert werden kann.

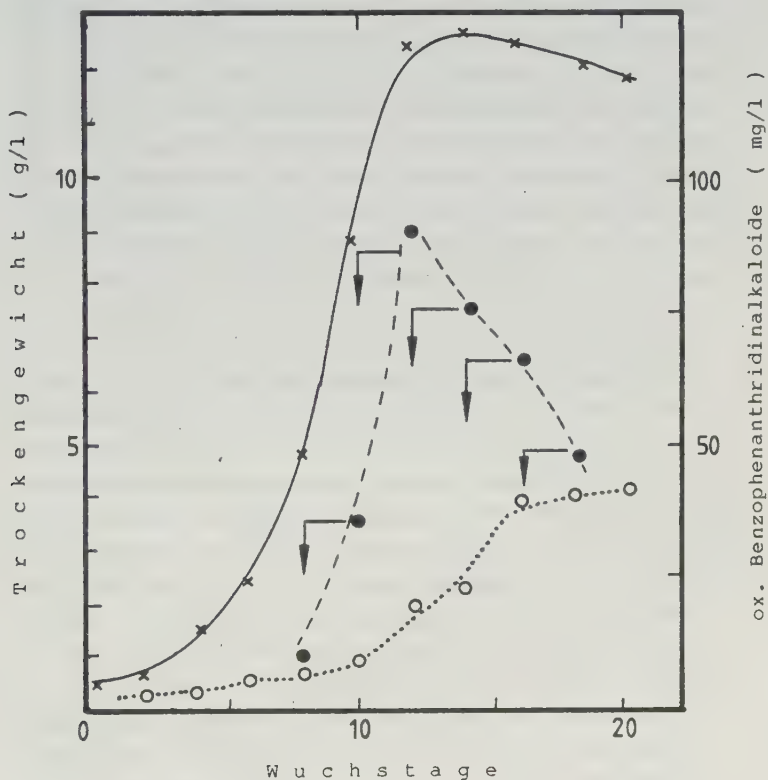


Abb. 9 Wuchskurve einer Zellkultur des Stammes W von *Eschscholtzia californica*. Angeimpft wurde am Tag 0 mit 4 g frischen Zellen. Die Kurve zeigt das Trockengewicht (x) und den Gehalt an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden (○). Dargestellt ist auch der Gehalt an diesen Alkaloiden nach Zugabe von 266 mg/l des ethanolgefällten Hefelicitors zum Medium (●). Die Pfeile (→) markieren den Zeitpunkt der Elicitorzugabe.

Bei geringeren Elicitorkonzentrationen jedoch stieg die Alkaloidproduktion der Suspensionskulturen fast linear mit der zugesetzten Elicitormenge an. Es zeigten sich weiterhin Unterschiede in der "Aktivität" verschiedener Elicitorpräparate. Während eine Konzentration von autoklavierter Bäckerhefe im Medium von 10 g/l zu einem Alkaloidgehalt der Kultur von 25.7 mg/l führte, ergibt sich schon bei einer zehnfach geringeren Konzentration des ethanolgefällten Elicitors (1 g/l) ein Alkaloidgehalt von 72 mg/l.

Die erwiesene Abhängigkeit der Alkaloidproduktion von der im Medium befindlichen Elicitorkonzentration stellt eine wesentliche Voraussetzung dar für einen Aktivitätsvergleich unterschiedlicher Elicitorpräparate.

Das beschriebene Testsystem bietet den Vorteil relativ hoher Genauigkeit. Die in 300 ml Erlenmeyerkolben angezogene Zellkultur wird zunächst von einem größeren und damit genauer meßbaren Inoculum ausgehend angezogen. Dies führt dazu, daß Wuchskurven, wie die in Abbildung 9 dargestellte, besser reproduzierbar sind. Zum anderen steht im Falle des größeren Zellsuspensionvolumens am Ende auch eine größere Gewebemenge zur Bestimmung von Gehalt und Trockengewicht der Kultur zur Verfügung.

Allerdings hat die Verwendung größerer Anzuchtkolben und damit größerer Gewebemengen auch zur Folge, daß zur Auslösung eines meßbaren Effektes der Steigerung des Alkaloidgehaltes große Elicitormengen pro Kolben gebraucht werden. Dieser Umstand ist beim Versuch einer Reinigung des Elicitors von großem Nachteil. Außerdem gestattet das beschriebene Verfahren einen hohen Probendurchsatz nur bei großem Arbeits- und Zeitaufwand.

Um die beschriebenen Nachteile zu vermeiden, wurde ein Mikrotestsystem entwickelt. Ziel war es, ein mög

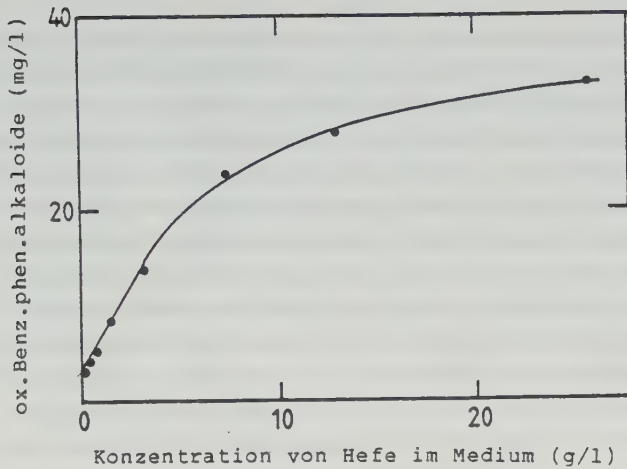


Abb. 10 Abhängigkeit des Gehalts an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden bei Stamm W einer Zellkultur von Eschscholtzia californica vom Gehalt autoklavierter Bäckerhefe im Medium 48 Stunden nach Zugabe der in Natriumcitratpuffer autoklavierten Hefe.

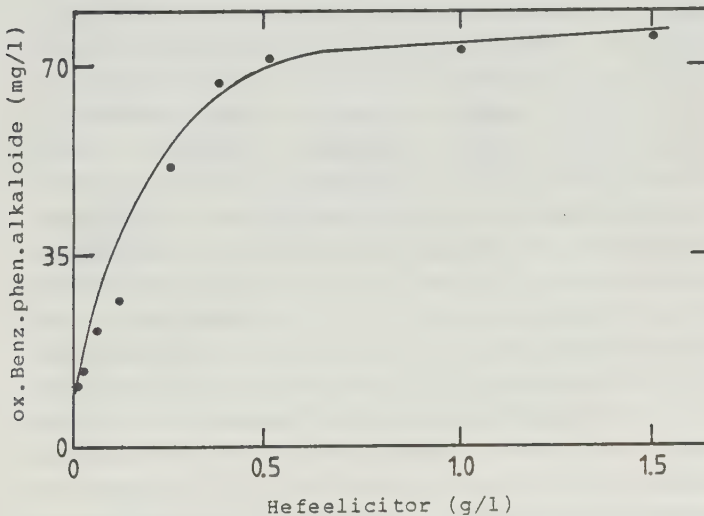


Abb. 11 Abhängigkeit des Gehalts an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden bei Stamm W von Eschscholtzia californica vom Gehalt des Mediums an ethanolgefälltem Hefeelcitor.

lichst kleines Volumen der zu testenden Suspensionskultur zu verwenden. Dies wurde durch Anzucht der Suspensionkulturen in sterilen Polystyrol-Kulturschalen mit je 24 Näpfen erreicht. Diese mußten, um eine ausreichende Durchmischung zu erreichen, mit 140 Umdrehungen pro Minute geschüttelt werden. Das Suspensionsvolumen in den einzelnen Näpfen betrug 1 ml. Als Problem erwies sich dabei das schnelle Eintrocknen der Näpfchen infolge des geringen Flüssigkeitsvolumens. Länger als vier Tage blieb die Flüssigkeit in den Schälchen nicht erhalten. Deshalb erfolgte eine vorherige Anzucht der Kultur in größeren Kolben.

Im einzelnen wurde folgendermaßen Verfahren: Zunächst wurden 300 ml Erlenmeyerkolben (75 ml Medium) mit einem Inoculum von 13 g (Frischgewicht) der Standardkultur des Stammes W angeimpft. Diese Kulturen wurden unter Standardbedingungen 12 Stunden lang kultiviert. Danach wurde aus den Kulturen unter sterilen Bedingungen jeweils 1 ml in die Näpfchen der Kulturschalen pipettiert. In diesen Näpfchen wurde die Kultur - mit 140 Umdrehungen pro Minute geschüttelt - für 8 Stunden weiter kultiviert. Nach dieser Zeit erfolgte, wieder unter sterilen Bedingungen, die Zugabe des Elicitors - gelöst in jeweils 200 µl Medium. Für weitere 2 Tage wurden die Kulturschalen unter den beschriebenen Bedingungen weiterkultiviert. Danach wurde die Suspensionkultur aus den Näpfen in Eppendorf Reaktionsgefäße abpipettiert. Das Volumen betrug jetzt in der Regel 1 ml. Die Näpfe wurden mit 500 µl nachgewaschen. Das Medium wurde durch 10minütiges Zentrifugieren in einer Eppendorf-Tischzentrifuge und Abdekantieren von den Zellen getrennt. Nach Zugabe von 1.5 ml EtOH:HCl(0.1N)/80:20 und Aufrühren wurden die Zellen 2 Stunden bei 60 °C extrahiert. Nach erneutem Abtrennen der Zellen durch Zentrifugation konnte der Gehalt an Benzophenanthridinalkaloiden entweder durch HPLC-Analyse bestimmt werden

oder, im Falle der oxidierten Alkaloide auch durch Messen der Extinktion bei 490 nm.

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen den Test bzw. das Testergebnis. Die zum Test auf Elicitoraktivität notwendige Elicitorkonzentration konnte zwar durch den Mikrotest nicht gesenkt werden, die für einen Test notwendige Mindestmenge des Elicitors konnte damit aber von 5 mg auf 66 µg erniedrigt werden. Schließlich ließ sich durch dieses Testverfahren auch bei geringem Arbeitsaufwand ein hoher Probendurchsatz erreichen. Beide Aspekte sind für eine Elicitorreinigung oder zum Beispiel für den Test von Säuleneluaten notwendige Voraussetzung.

3. Charakterisierung des Elicitors

3.1. Partielle Reinigung des Elicitors

3.1.1. Fraktionierte Ethanol-fällung

Mit den beschriebenen Testverfahren wurde nun versucht, eine weitere Reinigung der Komponente des Hefepreparates zu erzielen, die für die Induktion der Alkaloidbildung verantwortlich ist. Wie schon erwähnt stellt die Ethanol-fällung ein probates Mittel zur Anreicherung von Zuckermolekülen aus wäßrigen Extrakten dar (RASCHKE und BALLOU 1972, RING und SELVENDRAN 1981). Eine zusätzliche Reinigung sollte durch eine fraktionierte Ethanol-fällung erreicht werden. Die Aufarbeitung der Hefe erfolgte zunächst wie bereits beschrieben; die Extraktion wurde also durch Autoklavieren von 1 kg Bäckerhefe in 1.5 l Natriumcitrat-Puffer (10 mM, pH 7.5) für 60 Minuten durchgeführt.

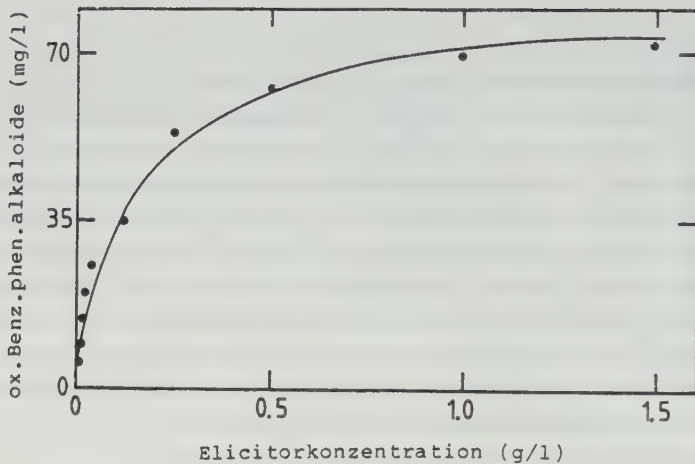


Abb. 12 Abhängigkeit des Gehalts an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden bei Stamm W einer Zellkultur von Eschscholtzia californica von der Konzentration des ethanol-gefällten Hefeelicitors im Mikrotestverfahren.

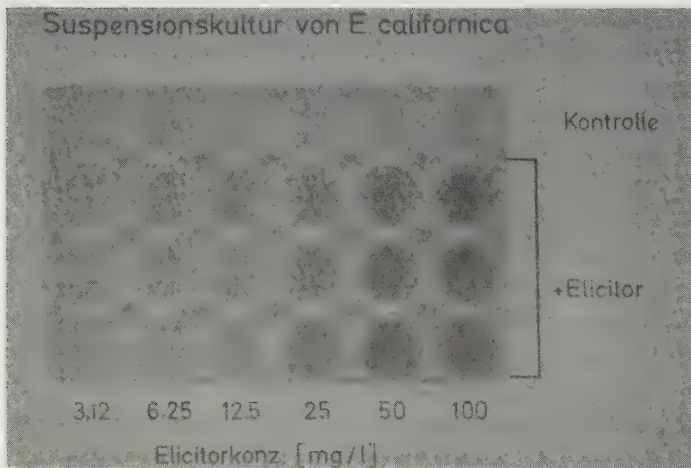


Abb. 13 Test auf Elicitoraktivität mit Stamm W einer Zellkultur von Eschscholtzia californica in Gewebekultur Multischalen mit 24 Näpfen. Jeder Napf enthält 1 ml Suspensionskultur und 0.2 ml LS-Medium mit verschiedenen Elicitorkonzentrationen bzw. ohne Elicitor (=Kontrolle).

Danach wurden die unlöslichen Bestandteile wieder durch Zentrifugation (20 Minuten bei 10 000 g) abgetrennt. Zum Überstand (1.3 l) wurden jetzt jedoch nicht 2 sondern nur ein zusätzliches Volumenteil Ethanol zugesetzt. Der Ansatz wurde zur quantitativen Ausfällung der Zucker über Nacht gerührt. Am nächsten Morgen wurde wiederum zentrifugiert (10 000 g, 20 Minuten). Der Überstand wurde erneut mit dem gleichen Volumen Ethanol wie zuvor versetzt (1.3 l) und erneut über Nacht gerührt. Der abzentrifugierte Niederschlag wurde in 300 ml H₂O resuspendiert und gefriergetrocknet (erhalten 20 g Substanz). Der Niederschlag der zweiten Fällung wurde ebenso wie das der ersten erhalten. Es ergab eine Substanzmenge von 3.8 g. Die beiden Präparate wurden anschließend auf ihre Elicitoraktivität getestet. Hierzu wurden 300 ml Erlenmeyerkolben verwendet die mit 4 g Suspensionszellen (Inoculum) angeimpft und 10 Tage lang gewachsen waren. Der Test erfolgte wie in Kapitel III.2. beschrieben. Dem Medium (75 ml) wurde nach 10 Wuchstagen jeweils 20 mg des zu testenden Elicitorpräparates zugesetzt (= 266 mg/l). Zum Vergleich wurden ebenfalls getestet: das gefriergetrocknete, zuvor in Citratpuffer autoklavierte Heferohpräparat und der unter Vakuum eingeengte Überstand des zweiten Fällungsschrittes. Das Elicitorpräparat der zweiten Ethanolfällung zeigte bei diesem Test die höchste spezifische Elicitoraktivität (siehe Abb. 14).

3.1.2. Dialyse

Es wurde nun versucht, durch Anwendung anderer Methoden, das durch fraktionierte Ethanolfällung gewonnene Elicitorpräparat weiter zu reinigen. Eine dieser Methode war die Dialyse. Hierzu wurden 300 mg des fraktioniert gefällten Elicitors in 10 ml Wasser

gelöst und gegen 150 ml Wasser für 2 Stunden dialysiert. Die 150 ml Außenmedium wurden anschließend gefriergetrocknet; sie enthielten ungefähr 20 % der wiedergefundenen Substanz (48 mg / davon 43 % Zucker). Die noch im Dialyseschlauch befindliche Substanz wurde anschließend über Nacht noch einmal gegen 5 l Wasser dialysiert. Danach wurde auch der Inhalt des Dialyseschlauches gefriergetrocknet (Ausbeute: 80 % der wiedergefundenen Substanz = 190 mg / davon 76 % Zucker). Die Elicitoraktivität der verschiedenen Fraktionen wurde im gleichen Test bestimmt wie die der verschiedenen Fraktionen der Ethanolfällung. Das Ergebnis (siehe Abb. 14) ist insofern interessant, als es zeigt, daß die Elicitorwirkung nicht nur auf eine niedermolekulare Substanz zurückgeführt werden kann. In diesem Fall hätte es sich auch um eine Substanz aus dem Bereich bekannter Pflanzenhormone handeln können, deren vielfältiger Einfluß auf den Sekundärstoffwechsel von pflanzlichen Zellkulturen zur Genüge dokumentiert ist.

3.1.3. Adsorption an XAD

Das zuletzt beschriebene Merkmal des Elicitors wird auch durch ein weiteres Experiment gestützt. Hierbei wurde versucht, den Elicitor an XAD zu adsorbieren. XAD stellt ein Adsorberharz dar, das im Gegensatz zu Ionenaustauschern nicht ionische sondern hydrophobe Substanzen adsorbiert. Häufig werden aber auch Proteine durch Adsorption von diesem Harz zurückgehalten während Zuckermoleküle fast nie gebunden werden und deshalb abgetrennt werden sollten (ARENS et al. 1982). Für den Versuch wurde eine Säule (1.5 cm x 5.6 cm = 10 ml Volumen) verwendet, die mit XAD-2 amberlite gefüllt war. Nach Benetzen mit MeOH wurde die Säule mit Wasser äquilibriert. 300 mg des im

zweiten Schritt der Ethanol-fällung gewonnenen Elicitors wurden, in 10 ml Wasser gelöst, auf die Säule gegeben. Es wurde mit 200 ml Wasser nachgewaschen. Der gesamte Durchlauf wurde aufgefangen und gefriergetrocknet. Er enthielt 205 mg Festsubstanz (davon 68 % Zucker). Die Säule wurde hierauf mit 100 ml reinem MeOH gespült. Das Methanol wurde unter Vakuum abgezogen. Es enthielt keine Festsubstanz in nennenswerten Mengen. Die im Durchlauf enthaltene Substanz wurde auf Elicitoraktivität getestet durch Zusatz von 20 mg Trockensubstanz, gelöst in 4 ml LS-Medium, zu Suspensionskulturen von Stamm W in 300 ml Erlenmeyerkolben wie die anderen Präparate auch (siehe Abb. 14). Sie zeigte kaum eine nennenswerte Verminderung der Elicitoraktivität.

3.1.4. Fällung mit Fehlingscher Lösung

Neben der Fällung mit Ethanol ist auch die Fällung mit Fehlingscher Lösung eine häufig gebrauchte Methode zur Reinigung von Zuckern. Es wurde deshalb versucht, Zuckerkomponenten mit Elicitoraktivität durch Zugabe von Fehlingscher Lösung auszufällen. Es wurde vorgegangen nach einer Vorschrift von KOCOUREK und BALLOU (1969). 300 mg des mit Ethanol ausgefällten Elicitors wurden hierzu in 10 ml Natrium-Citrat Puffer (20 mM, pH 7.0) gelöst. Es erfolgte nun die Zugabe von 10 ml Fehlingscher Lösung unter leichtem Rühren. Nach zweistündiger Fällung wurde das Präzipitat durch leichte Zentrifugation in einer Tischzentrifuge abgetrennt. Das abzentrifugierte Präzipitat wurde in 10 ml Wasser wieder resuspendiert und anschließend gegen 5 l Wasser dialysiert. Diese Dialyse sollte das bei der Fällung eingetragene Kupfer wieder von den Zuckern trennen. Die Kupferionen hätten den Einsatz der gewonnenen Zuckerfraktionen in den Bio-

test unmöglich gemacht. Nach Gefriertrocknung des dialysierten Zuckers verblieben 20 mg Trockensubstanz. Hiervon wurden je 10 mg in einen 300 ml Erlenmeyerkolben einer wie beschrieben angezogenen Suspensionskultur von Eschscholtzia californica Stamm W zum Test eingesetzt. Wie Abbildung 14 zeigt war die so erhaltene Zuckerfraktion nicht mehr als Elicitor aktiv.

3.1.5. Gelchromatographie

Ebenso wie zur Reinigung von Proteinen wird die Gelpermeationschromatographie häufig zur Trennung polymerer Zuckermoleküle verwendet. Viele publizierte Reinigungsmethoden für Elicitoren verwenden die Gelchromatographie (AYERS et al. 1976, DE WIT et al. 1985). Die Anwendung der Gelchromatographie kann hierbei auch zeigen, ob es sich bei der Induktion der Alkaloidbildung auslösenden Komponente im beschriebenen Hefepräparat um eine homogene Substanz handelt.

Zur gelchromatographischen Analyse des durch Ethanol-fällung gewonnenen Hefepräparates wurde das Trennmateri al Sephadex G-75 verwendet. Die Abmessungen der Säule waren 2.5 cm x 90 cm, das Gelbettvolumen somit 440 ml. Die Säule war mit Wasser äquili brier t. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 25 ml/h. Aufgetrennt wurden 300 mg Elicitor, die in 2 ml Wasser gelöst worden waren. Das Säuleneluat wurde zeitprogrammiert in Fraktionen von je 20 Minuten aufgefangen. Hierbei ergab sich ein Fraktionsvolumen von ungefähr 8 ml. Die Elicitoraktivität in den einzelnen Fraktionen wurde durch Einsatz von 200 µl in den beschriebenen Mikrotest ermittelt. Der Proteingehalt wurde durch Messen der Extinktion bei 280 nm abgeschätzt. Der Zuckergehalt wurde mit dem Anthrontest bestimmt.

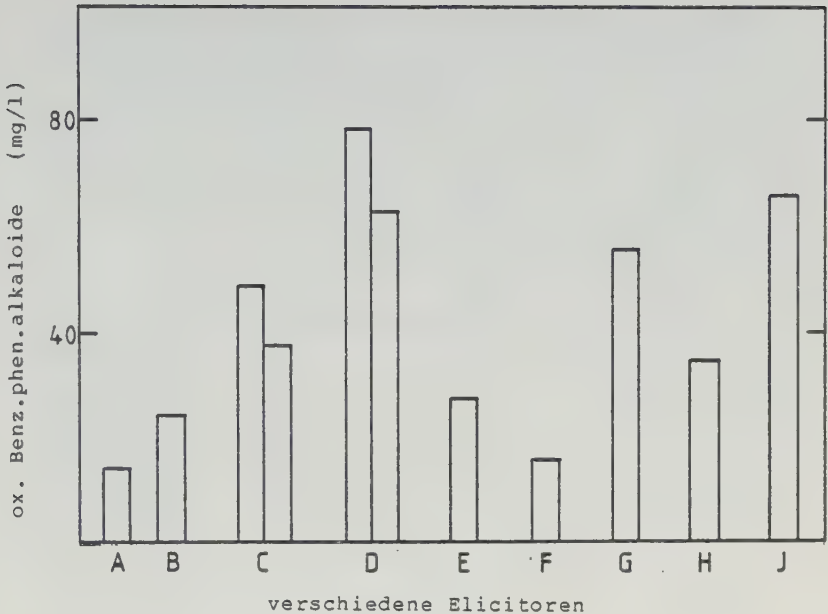


Abb. 14 Dargestellt ist der Gehalt von Eschscholtzia californica Zellsuspensionskulturen (Stamm W) an oxidierten Benzophenanthridin-alkaloiden (optisch bestimmt) nach Zusatz unterschiedlicher Elicitorpräparate zum Kulturmedium. Nach Inoculation mit 4 g frischen Zellen und 10 Tagen Wuchs wurde den Kulturen das jeweilige Elicitorpräparat zugesetzt. Die Endkonzentration im Medium war 266 mg/l. Nach 48 h wurden die Kulturen geerntet, extrahiert und die Alkaloidgehalte bestimmt. Die Kulturen enthielten:

A: keinen Elicitor; B: Rohhefe in Citratpuffer autoklaviert; C a u. b: Hefeelicitor nach Fällung mit einem Volumenteil Ethanol; D a u. b: Hefeelicitor nach Fällung mit zwei Volumenteilen Ethanol; E: Trockensubstanz im Überstand der zweiten Ethanolfällung; F: durch Fehling'sche Lösung ausgefällte Substanz; G: im Dialyseschlauch verbliebene Substanz; H: ins Aussemmedium abdialysierte Substanz; J: Durchlauf-fraktion der XAD Säule.

Abbildung 15 zeigt das Elutionsprofil der beschriebenen gelchromatographischen Auftrennung. Es zeigt eindeutig, daß die Elicitoraktivität bei Molekülen von recht verschiedener Größe vorhanden sein muß, und bestätigt erneut, daß die elicitierende Komponente des Hefepräparates keine einfache niedermolekulare Substanz sein kann.

3.1.6. Adsorption an DEAE-Cellulose

Ebenfalls häufig wird die Chromatographie an DEAE-Cellulose zur Reinigung von Zellwandzuckern verwendet. Bei dieser Methode durchlaufen neutrale Zuckermoleküle die Säule während geladene Zuckermoleküle, wie zum Beispiel Uronsäuren oder Glykoproteine, gebunden werden können (BAUER et al. 1973, DARVILL et al. 1978). Auch bei der Isolierung von Elicitoren der Phytoalexinbildung aus Zellwänden ist dieses Verfahren häufig angewendet worden (AYERS et al. 1976, HAHN et al. 1981, DE WIT et al. 1985).

Es wurde daher versucht, eine Elicitorreinigung durch Chromatographie an DEAE-Cellulose zu erreichen. Die verwendete stationäre Chromatographiephase war DE-52 der Firma Whatman. Als Elutionspuffer wurde 10 mM Kaliumphosphatpuffer mit einem pH Wert von 7.5 verwendet. Die benutzte Säule hatte ein Volumen von 30 ml (Abmessungen: 1.5 x 30 cm). Auf die Säule wurden 300 mg Elicitor in 4 ml Elutionspuffer gelöst aufgegeben. Die Säule wurde anschließend mit 120 ml Elutionspuffer gewaschen. Jetzt wurde mit einem im Elutionspuffer linear ansteigenden Salzkonzentrationsgradienten von 0 bis 500 mM NaCl eluiert. Diese Gradientenelution erfolgte 5 Stunden lang mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 1 ml/min (= 300 ml). Zuletzt wurde die Säule bei gleicher Pumpgeschwindigkeit mit 60 ml Elutionspuffer mit einer Salzkonzen-

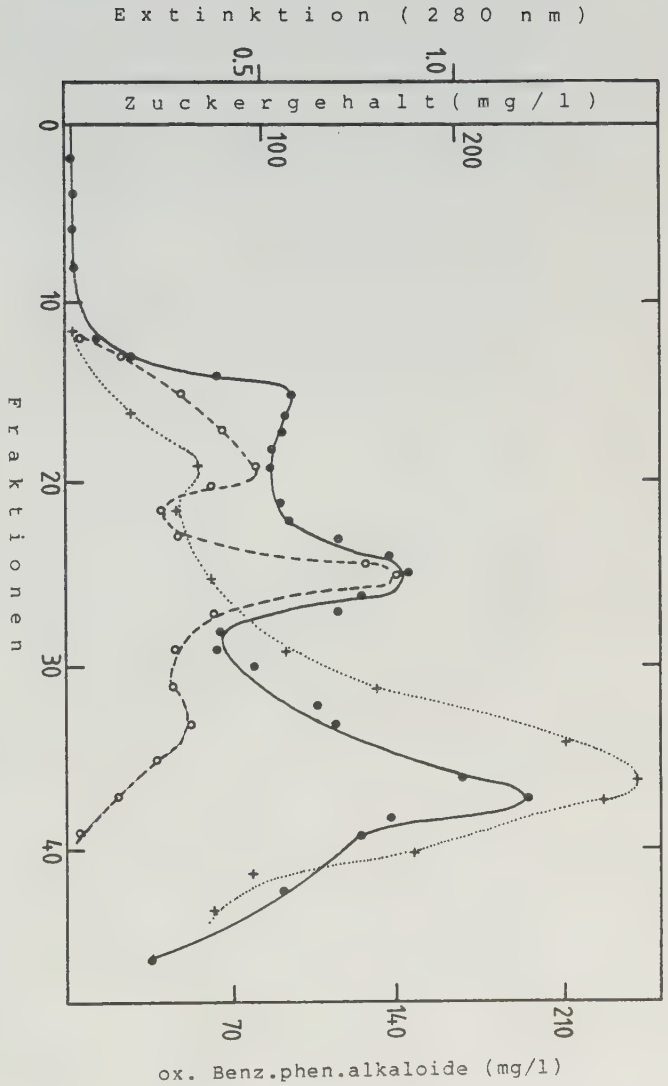


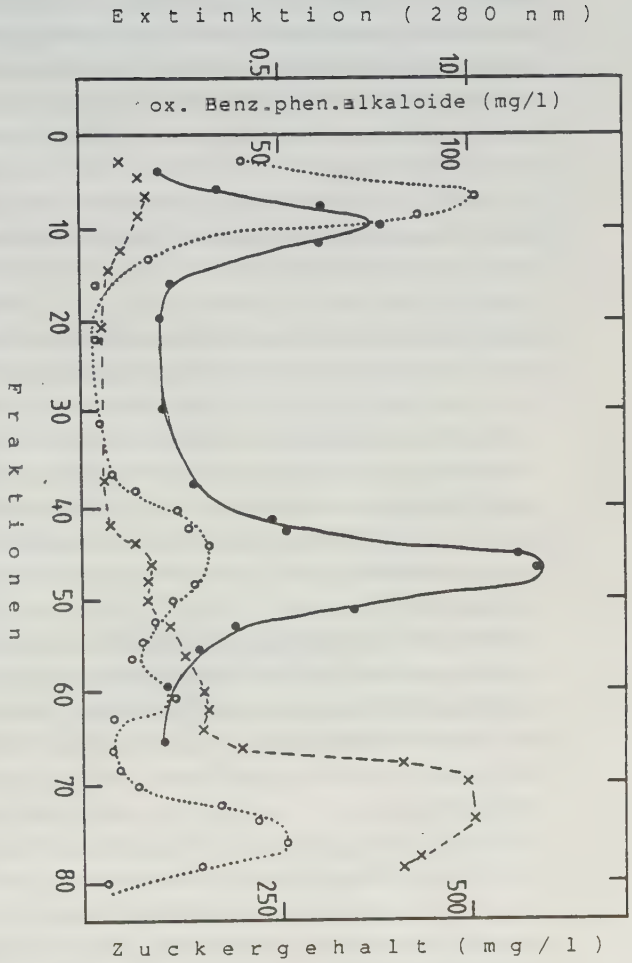
Abb. 15

Auftrennung des durch frakt. Ethanol-fällung gewonnenen Elicitors durch Gelchromatographie an Sephadex G-75. Säulenabmessungen: 2.5 x 90 cm; Elutionsmittel: Wasser; Elutionsgeschwindigkeit 25 ml/h; Aufgabe: 300 mg Substanz in 2 ml Wasser gelöst; Fraktionsvolumen 8 ml. Gemessen wurde die Ext. (X) (280 nm), der Zuckergehalt (○) (Anthrone test) und die Elicitoraktivität im Mikrottestverfahren (●) (siehe Kapitel II.2).

tration von 500 mM NaCl gewaschen. Säulendurchlauf, Gradienteneluat und der Waschpuffer wurden in insgesamt 80 Fraktionen zeitprogrammiert aufgefangen (eine Fraktion = 6 Minuten). Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde in erster Näherung durch Messen der Absorption bei 280 nm bestimmt. Der Zuckergehalt der Fraktionen wurde im Anthrontest gemessen, der Salzgradient durch Messen der Leitfähigkeit verfolgt und die Elicitoraktivität der Fraktionen durch Einsatz von 200 µl des Fraktionsvolumen in den beschriebene Mikrottest ermittelt. Abbildung 16 zeigt das Elutionsprofil.

In einem zweiten Versuch sollte durch stufenweise Elution eine präparative Elicitorreinigung erfolgen. Hierzu wurde eine Säule mit 26 ml Volumen (8 x 2 cm) mit DE-52 Material der Firma Whatman gepackt. Äquibriert wurde die Säule ebenfalls mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer mit einem pH Wert von 7.5. Auf die Säule aufgegeben wurden 100 mg eines in Säulenpuffer (10 ml) gelösten und durch fraktionierte Ethanol-fällung vorgereinigten Elicitorpräparates. Nach Ethanol-fällung war die Substanz zusätzlich durch Dialyse gereinigt worden. Nach Aufgabe der 10 ml Elicitorlösung wurde die DEAE-Säule mit 50 ml Puffer nachgewaschen. Die erhaltenen 60 ml wurden über Nacht gegen 5 l Wasser dialysiert. Die Durchlaufraktion wurde anschließend gefriergetrocknet. Sie enthielt 150 mg Trockensubstanz. Es erfolgte nun eine Elution der Säule mit einem Anstieg der NaCl Konzentration im Elutionspuffer in diskreten Stufen. Die Stufen waren 250 mM NaCl, 500 mM NaCl, 750 mM NaCl, 1000 mM NaCl. Zur Elution wurden für jede Stufe 50 ml Elutionspuffer verwendet. Anschließend erfolgte wie im Falle der Durchlaufraktion eine Dialyse. Nur in der Stufe bis 250 mM NaCl im Elutionspuffer konnten Substanzen mit Elicitoraktivität von der Säule gewaschen werden (60 mg). Die Elution mit höheren Salzkonzentrationen

Abb. 16



Auftrennung des durch frakt. Ethanolfällung gewonnenen Elicitors durch Chromatographie an DEAE-Cellulose (DE-52, Whatman). Säulenabmessungen: 1.5 x 30 cm; Elutionspuffer: 10 mM Phosphatpuffer pH 7.5; Elution: mit Gradient von 0-500 mM NaCl im Elutionspuffer; Elutionsgeschwindigkeit: 1 ml/min, Aufgabe: 300 mg Elicitor in 10 ml Elutionspuffer gelöst; Fraktionsvolumen: 6 ml. Gemessen wurde die Extinktion (280 nm) (●), der Zuckergehalt (Anthrontest) (○), und die Elicitoraktivität im Mikrottestverfahren (●) (siehe Kapitel III.2.) bei den Fraktionen

löste keine weiteren aktiven Substanzen mehr von der Säule. Die Elicitoraktivität der erhaltenen Fraktionen wurde im Standardtestverfahren mit Suspensionkulturen in 300 ml Erlenmeyerkolben durch Zusatz von jeweils 20 mg Substanz pro Kolben getestet. Kulturen ohne Elicitorzusatz enthielten 14 mg/l an oxidierte Benzophenanthridinalkaloiden. Zusatz der Durchlauf-fraktion steigerte den Gehalt auf 73 mg/l, Zusatz der Eluatfraktion auf 65 mg/l.

3.2. Charakterisierung des Elicitorpräparates

3.2.1. Analyse der über Chromatographie an DEAE-Cellulose gewonnenen Elicitorpräparate

Die Zusammensetzung und Größe der durch fraktionierte Ethanol-fällung, Dialyse und Chromatographie an DEAE-Cellulose gewonnenen Präparate sollte nun genauer analysiert werden. Für die weiteren Versuche wurden die Präparate für 4 Tage bei 60 °C im Vakuum getrocknet.

Zunächst sollte das ungefähre Molekulargewicht der Elicitorpräparate durch Hochdruckgelpermeationschromatographie festgestellt werden. Verwendet wurde hierzu ein Säulensystem aus μ -Porasil 60 + μ -Bondagel 125. Vorgeschaltet war eine 10 cm lange Vorsäule (Säulenmaterial I-125 Fa. Waters). Als Eluens wurde 200 mM Kaliumphosphatpuffer mit pH 6.0 verwendet. Injiziert wurden 15 μ l einer Lösung von 1 mg Elicitor in 1 ml Elutionspuffer. Die Flußgeschwindigkeit betrug 16 ml/h. Das Molekulargewicht wurde durch Vergleich mit Eichsubstanzen bestimmt. Die Analyse ergab eine Schwankung im Molekulargewicht der Hauptkomponenten in einem Bereich von 10 000 Dalton bis 30 000 Dalton. Das Ergebnis war gleich für die aus dem

Durchlauf und dem Eluat der DEAE-Cellulosesäule isolierten Substanzen.

Da es sich auch in diesem Fall bei dem Elicitor um ein Zuckerpolymer aus der Pilzzellwand handeln könnte, sollte die Zuckerzusammensetzung des Elicitorpräparates bestimmt werden. Eine quantitativ exakte Zuckeranalyse wird in der Regel nach Hydrolyse des Zuckerpolymers und anschließender Acetylierung der Monomeren Zucker mit Hilfe der Gaschromatographie durchgeführt. Die Untersuchungen wurden gemeinsam mit dem Lehrstuhl von Prof. Wagner, München, durchgeführt. Jeweils 1 mg der zu untersuchenden Proben wurden zunächst mit Trifluoressigsäure hydrolysiert. Schon jetzt wurde als interner Standard Inositol zugegeben. Nach Abziehen der Säure im Vakuum wurde die Substanz in Ammoniak gelöst und mit Natriumborhydrid reduziert. Die reduzierten Zucker konnten jetzt durch Essigsäureanhydrid acetyliert und die entstandenen Alditolacetate mit Dichlormethan ausgeschüttelt werden. Die Dichlormethanfraktion konnte direkt für die GC-Analyse benutzt werden. Aufgrund der GC-Analyse ergab (genaue Bedingungen siehe Kapitel II.2.2.1.) sich für die Durchlaufraktion ein Zucker-gehalt von 25 % für die Eluatfraktion nur ein Zucker-gehalt von 10.5 %. Wichtig war die Erkenntnis, daß in beiden Fraktionen nur Mannose als Zuckermonomer vorhanden war.

3.2.2. Fällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Die bisherigen Ergebnisse ließen nach wie vor keinen Schluß darüber zu, ob der eigentliche Elicitor Zucker- oder Peptidcharakter hat. Peptide und Proteine können durch Trichloressigsäure gefällt werden während Zucker in Lösung bleiben sollten. Eine TCA

Fällung schien daher geeignet, Peptide und Proteine die neben Zuckermolekülen im Elicitor vorliegen von diesen zu trennen. Eine solche TCA-Fällung wurde durchgeführt, indem 300 mg des ethanolgefällten Hefepräparates in 15 ml H₂O gelöst und anschließend 15 ml 20 prozentige TCA-Lösung zugegeben wurde. Nach 20 Minuten wurden die ausgefallenen Bestandteile bei 10000 g 15 Minuten lang abzentrifugiert. Das abzentrifugierte Pellet wurde in 15 ml Wasser resuspendiert und gegen 5 l Wasser dialysiert, um restliche Trichloressigsäure abzutrennen. Die im Dialyseschlauch verbliebene Substanz (60 mg) wurde anschließend gefriergetrocknet und durch Zugabe zu einer Suspensionskultur in 300 ml Erlenmeyerkolben auf Elicitoraktivität getestet. Die nicht mit Elicitor versetzten Kulturen enthielten in diesem Test 12 mg Benzophenanthridinalkaloide pro l Medium. Wurden einem Kolben 20 mg des Ausgangselicitors zugesetzt betrug der Alkaloidgehalt nach 48 Stunden 77 mg/l Medium. Wurden dagegen 20 mg der mit TCA ausgefallten Substanz zugesetzt, stieg der Alkaloidgehalt nur auf 17 mg/l Medium an.

3.2.3. Elicitorverdau durch Proteinase K

Es sind bis jetzt Peptide wie das Molinocolin (CRUICKSHANK et al. 1968), Enzyme wie die von LEE und WEST 1978 beschriebene Polygalakturonase oder Zuckermoleküle (SHARP et al. 1984) als Elicitor der Phytoalexinbildung beschrieben. Es ist aber auch möglich, daß ein Elicitor sowohl Peptid- als auch Zuckerkomponenten enthält (DE WIT et al. 1981). Bei einer TCA-Fällung könnte so durch eine große Zuckerkomponente ein kleines angebundenes Peptid in Lösung gehalten haben. Eine Elicitoraktivität, die auf ein Protein oder Peptid zurückgeht, sollte durch die Ein-

wirkung einer starken Protease zerstört werden können. Um dies zu prüfen, wurden zu 5 ml Elicitorlösung (enthalten 100 mg des mit Ethanol gefällten Elicitors) 500 µl SDS-Lösung (10 %) und 1 mg Proteinase K gegeben. Unter leichtem Rühren wurde die Lösung 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Protease wurde anschließend durch Autoklavieren des Ansatzes inaktiviert. Nach Dialyse wurde die Elicitoraktivität des erhaltenen Präparates durch Zugabe zu 300 ml Erlenmeyerkolben mit der Eschscholtzia californica Zellkultur getestet. Zum Vergleich wurde zweimal autoklavierter Ausgangselicitor und autoklavierte Proteinase K in den Test eingesetzt. Zugabe des Ausgangselicitors erhöhte den Alkaloidgehalt von 12 mg/l Medium auf 43 mg/l Medium. Die gleiche Menge (10 mg pro 300 ml Kolben) des mit Proteinase K behandelten Elicitors erhöhte den Gehalt immerhin noch auf 35 mg/l Medium. Autoklavierte Proteinase K veränderte den Alkaloidgehalt der Zellkultur nicht.

3.2.4. Spaltung mit Natriumperjodat

Nach den bisherigen Experimenten schien eine Beteiligung von Peptidmolekülen an der Induktion der Alkaloidbildung unwahrscheinlich. In einem weiteren Experiment sollten Hinweise für die Beteiligung von Zuckern gesucht werden. Perjodat oxidiert vicinale Dirole unter Spaltung zu Aldehyden und ist daher geeignet die Struktur polymerer Zuckermoleküle zu zerstören. Geht die Elicitoraktivität eines Elicitors nach Behandlung mit Perjodat verloren, ist das häufig als ein Hinweis auf seinen Polysaccharidcharakter gesehen worden (AYERS et al. 1976, DE WIT et al. 1985). Um die Sensitivität unseres Elicitors gegenüber Perjodat zu testen wurden 100 mg des Elicitors in 5 ml Wasser gelöst. Das Elicitorpräparat war durch

Ethanol-fällung gewonnen und zusätzlich durch Dialyse gegen Wasser gereinigt worden. Es erfolgte die Zugabe einer Lösung von 1,2 g Natriumperjodat in 10 ml Wasser. Nach 24 Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde das Perjodat durch Dialyse abgetrennt und die verbliebene Substanz (60 mg) nach Gefrier-trocknung auf Elicitoraktivität getestet. Der so behandelte Elicitor zeigte im Test in 300 ml Kolben keinerlei Aktivität mehr. Getestet wurden ebenfalls Substanzen, die bei der Dialyse ins Außenmedium gelangt waren. Auch sie zeigten keine Elicitoraktivität.

3.2.5. Gleichzeitige Anwendung des Hefeelicitors mit Methylmannose

Im Jahr 1976 berichteten AYERS et al. eine merkwürdige Erscheinung bei der Auslösung der Glyceollinproduktion durch Sojabohnenkotyledonen mit einem Elicitor aus Phytophthora megasperma Zellwänden. Die gleichzeitige Gabe von Methylmannose hemmt die Wirkung des Pilzelicitors. Die Autoren erklärten dieses Phänomen durch Wechselwirkungen dieser Substanzen mit hypothetischen Rezeptoren, die für die Wirkung des Pilzelicitors verantwortlich sind. Sie werteten das Ergebnis als Hinweis auf den Zuckercharakter des Pilzelicitors. Erst viel später konnte gezeigt werden, daß in diesem Fall wirklich ein Glucosepolymer die eigentliche Elicitorkomponente war. Da in unserem Fall nur Mannose als Zuckerbestandteil des aus Hefe gewonnenen Elicitors nachgewiesen werden konnte, schien die gleichzeitige Gabe von Elicitor und Methylmannose auch in unserem Fall interessant. Der Versuch wurde wieder mit Suspensionkulturen in 300 ml Erlenmeyerkolben (75 ml) durchgeführt. Nach 10 Wuchs-

tagen wurden Kolben mit verschiedenen Mengen an Methylmannose versetzt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurde den Kolben zusätzlich 10 mg Hefeelictor zugegeben. Als Kontrolle wurden den Kolben zum einen verschiedene Mengen Hefeelictor ohne Methylmannose, zum anderen Methylmannose ohne Hefeelictor zugegeben. Abbildung 17 zeigt, daß die vorherige Zugabe von Methylmannose die Reaktion der Zellkultur auf Zugabe des Hefeelictors nicht etwa hemmt, sondern in jedem Fall steigert. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse von AYERS et al. (1976) ist dieses Ergebnis ein Hinweis darauf, das es sich in unserem Fall um einen Elicitor auf Mannosebasis handelt.

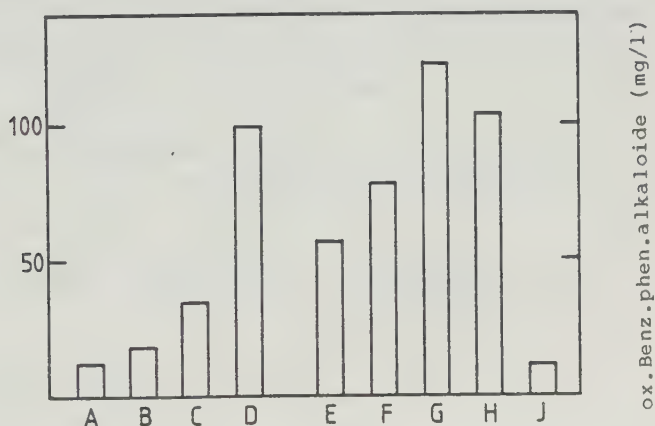


Abb. 17 Induktion der Bildung oxidierten Benzophenanthridine nach Zugabe von Methylmannose und Hefeelictor. Der Test wurde durchgeführt mit Stamm W von Eschscholtzia californica in 300 ml Erlenmeyerkolben. Den Kulturen wurde im einzelnen zugegeben: A: kein Elicitor; B: Hefeelictor (65 mg/l); C: Hefeelictor (130 mg/l); D: Hefeelictor (260 mg/l); E: Hefeelictor (130 mg/l) u. Methylmannose (1.3 g/l); F: Hefeelictor (130 mg/l) u. Methylmannose (2.6 mg/l); G: Hefeelictor (130 mg/l) u. Methylmannose (4 g/l); H: Hefeelictor (130 mg/l) u. Methylmannose (6 g/l); J: Methylmannose (6 g/l).

4. Untersuchungen zur Spezifität der Beziehung von "Elicitor" und "Phytoalexin"

Bei bekannten Systemen der Phytoalexinbildung zeigt sich oft eine hohe Spezifität zwischen der Wirtspflanze und dem Pathogen; andererseits gibt es eine Anzahl von Substanzen, die recht unspezifisch die Phytoalexinbildung auslösen (vergl. BROOKS und WATSON 1985, KAUSS 1986). Im folgenden Kapitel werden Untersuchungen beschrieben, die klären sollten, wie weit andere Elicitorpräparate die Benzophenanthridinbildung bei Eschscholtzia californica stimulieren und wieweit das von uns gewonnene Hefepräparat den Sekundärstoffwechsel von Zellkulturen verwandter Pflanzenarten beeinflußt.

4.1. Induktion der Benzophenanthridinsynthese durch verschiedene Elicitorpräparate

4.1.1. Untersuchung der Elicitoraktivität verschiedener Pilzkulturen

Am Institut standen verschiedene Pilzkulturen zur Verfügung. Die Kulturen wurden angezogen auf einem Medium aus Kartoffelextrakt, das mit Glucose als Kohlenstoffquelle versetzt wurde. Die Kultivierung erfolgte auf Petrischalen mit 9 cm Durchmesser. Das Medium wurde mit Agar verfestigt. Nach Abschluß des Generationszyklus wurde die Pilzmasse vom Agarmedium abgekratzt. Der gewonnenen Pilzmasse wurde pro mg Substanz 1 ml Natriumcitratpuffer zugesetzt. Anschließend wurde für 60 Minuten autoklaviert. Der Test der so gewonnenen Suspension erfolgte zum einen durch Aufbringen auf Kalli, zum anderen durch Zugabe

von ungefähr 200 µl in einen mit Suspensionkultur gefüllten Napf der Mikrotestkulturschalen. Tabelle 4 zeigt das Ergebnis. Zum Vergleich wurde jeweils eine definierte Menge des aus Hefe isolierten Standardelicitors eingesetzt. Die gemessene Elicitoraktivität ist angegeben als Prozentsatz des durch den Standardelicitor im Test erreichten Zellkulturgehaltes an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden. Alle getesteten Pilze führten zu einem erhöhten Gehalt der Zellkultur an oxidierten Benzophenanthridinen. Allerdings konnte kein Pilz gefunden werden, der eine größere Aktivität aufwies als die ursprünglich isolierten oder der Hefeelicitor.

4.1.2. Induktion der Benzophenanthridinbildung durch andere Elicitorpräparate

Die Versuche mit verschiedenen Pilzen zeigten, daß offenbar keine enge Spezifität zwischen der Zellkultur und dem Pilz besteht. Dieses Ergebnis war angesichts der Erfahrungen mit der aus Bäckerhefe isolierten Elicitoraktivität zu erwarten gewesen. Gerade vor diesem Hintergrund schien es wichtig, auch Elicitorpräparate aus anderen bekannten Systemen zu testen. Hierzu wurde uns freundlicherweise von Prof. Ebel, Freiburg, ein Rohpräparat des Pms-Elicitors überlassen. Dr. Matern, Freiburg, stellte ein Elicitorpräparat, das aus Alternaria isoliert worden war, zur Verfügung. Hierbei handelte es sich um ein Skleroglucan. Darüberhinaus wurden verschiedene chemisch definierte Elicitoren getestet, die käuflich zu erwerben waren. Es handelte sich im einzelnen um Chitosan, Nigeran, Poly-L-Lysin, Ribonuclease. Die Aktivität der genannten Elicitoren wurde, wie die Aktivität des Standardelicitors aus Hefe, in dem beschriebenen Mikrotestverfahren bestimmt. Zum Vergleich wurde

Getestete Pilze	% Elicitor- aktivität
<i>Armillaria mellea</i> (FO24049 n)	23
<i>Botryobasidium subcoronatum</i> (FO 24472)	15
<i>Tremella mesenterica</i> (FO 24610)	13
<i>Rhodosporidium spec.</i> (FO 25517i)	5
<i>Hyphodontia pallidula</i> (FO 25161)	11
<i>Protomyces macrosporus</i> (FO 25646-1)	32
<i>Dacrymyces stillatus</i> (FO 28136)	7
<i>Endophyllum sepmervivi</i> (FO 28236)	2
<i>Coleosporium tussilaginis</i> (FO 28237)	8
<i>Hyphoderma praetermissum</i> (FO 31753)	42
<i>Sebacina penetrans</i> (FO 31759)	2
<i>Microstroma juglandis</i> (FO 32601)	1
<i>Chlorosplenium aeruginosum</i> (FO 34660)	17
<i>Corticium caeruleum</i> (FO 35226)	12
<i>Auriscalpium vulgare</i> (FO 36151)	21

Tab. 4 Elicitoraktivität von Zellen verschiedener Pilzkulturen. Die Pilze wurden auf mit Agar verfestigtem Kartoffelmedium angezogen. Das vom Festmedium abgekratzte Pilzmycel wurde mit Citratpuffer (20 mM, pH 7.5, 1 mg/ml) autoklaviert. 200 µl wurden in den Mikrottest eingesetzt. Als 100 % Elicitoraktivität wurde die Menge an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden gewertet, die in Kulturen mit einer entsprechenden Menge des Hefeelicitors im Medium (200 mg/l) gebildet worden war.

wieder eine definierte Menge des Standardelicitors aus Hefe eingesetzt. Vor allem interessant war die Frage, ob der Glucan Elicitor auch im Falle der hier verwendeten Zellkultur Elicitoraktivität zeigte. Das Ergebnis fiel eindeutig negativ aus. Auch die käuflichen Substanzen zeigten eine so geringe Erhöhung des Benzophenanthridingehaltes der Zellkultur, daß man kaum von einer wesentlichen Elicitoraktivität spre-

chen kann. Lediglich der Skleroglucanelicitor aus Alternaria zeigte eine, dem aus Hefe isolierten Präparat vergleichbare, wenn auch geringere, Aktivität.

zugesezter Elicitor	Konz.	im Mikrottest gemessener Alkaloidgehalt
ohne Elicitor		27.4 mg/l
Hefeelicitor	250 mg/l	117.6 mg/l
Pms-Elicitor*	250 mg/l	20.5 mg/l
Skleroglucan Elic.	250 mg/l	47.5 mg/l
Chitosan	2000 mg/l	19.9 mg/l
Nigeran	500 mg/l	35.0 mg/l
Poly-L-Lysin	500 mg/l	32.5 mg/l
Ribonuclease	500 mg/l	32.5 mg/l

Tab. 5 Induktion der Bildung oxidierte Benzophenanthridinalkaloide durch Stamm W von Eschscholtzia californica nach Zusatz verschiedener Elicitoren. Der Test wurde im beschriebenen Mikrottestverfahren durchgeführt; der Alkaloidgehalt optisch bestimmt. * der Pms-Elicitor wurde nicht im Mikrottest sondern in 300 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt.

4.1.3. Elicitoraktivität verschiedener Zuckerpolymere

Weiteren Aufschluß über die Spezifität des Elicitors sollte darüberhinaus der Einsatz wahllos beschaffter polymerer Zuckermoleküle bieten. Wegen des Mannosegehaltes unseres Hefeelicitors wurde dabei auch die Elicitoraktivität zweier käuflicher Mannane getestet. Verfahren wurde wieder nach der beim Test verschiedener Elicitoren angewendeten Methode. Die untersuchten Substanzen zeigten allerdings keinerlei

Elicitoraktivität. Eine Reihe nicht klar definierter Zuckerpolymere pflanzlicher Herkunft wurde uns von Dr. Stuppner, München, zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um grob gereinigte pflanzliche Mannane, Glucane, Glucomannane, die alle durch wäßrige Extraktion und Ethanol-fällung aus Echinacea purpurea gewonnen worden waren. Keine der getesteten Substanzen zeigte jedoch eine Elicitoraktivität im Mikrotestsystem. Zum Abschluß wurde auch versucht, nach der für die Isolierung des Elicitorpräparates aus Hefe angewandten Methode, aus Zellen von Stamm W der Eschscholtzia californica Zellkultur einen endogenen Elicitor zu isolieren. Hintergrund hierfür war die Oligosaccharinhypothese von ALBERSHEIM (1985). Wegen des höheren Gehaltes an Macarpin sollte dazu eine Kultur von Stamm TR verwendet werden. Es wurden 230 g frische Stamm-TR-Zellen in 350 ml Natriumcitratpuffer autoklaviert und wie beschrieben abzentrifugiert. Anschließend erfolgte eine fraktionierte Ethanol-fällung. Hierbei wurden im ersten Fällungsschritt 80 mg Substanz, im zweiten 515 mg isoliert. In den Mikrottest eingesetzt zeigten beide Fraktionen jedoch keine Elicitoraktivität.

4.1.4. Elicitoraktivität bakterieller Zellwandzucker

Als pflanzenpathogene Organismen kommen nicht nur Pilze, sondern auch Bakterien in Betracht. ALBERSHEIM (1985) vertrat kürzlich die Ansicht, Bakterien seien zur Auslösung der Phytoalexinbildung bei Pflanzen nur durch Freisetzung entsprechender Elicitoren aus der Pflanzenzellwand mit Hilfe spezifischer Enzyme in der Lage. Trotzdem wurde der Frage nachgegangen, inwieweit Zuckerpräparate aus bakteriellen Zellwänden in unserem System Elicitoraktivität zeigten. Eine große Zahl solcher schon vorgereinigter

Präparate wurde freundlicherweise von Prof. Fiedler, München, zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um Zellwandpräparationen von Bakterien der Gattungen *Brevibacterium* und *Corynebacterium*. Auch der Test dieser Präparate erfolgte, wie die bereits beschriebenen, im Mikrotestverfahren. Die Zellwandpräparate waren in LS-Medium unlöslich und wurden deshalb als Suspensionen in den Test eingesetzt. Eine feine Suspension und damit gleichmäßige Elicitorzugabe wurde durch Ultrabeschallung erreicht. Tabelle 6 zeigt das Ergebnis. Von allen bisher getesteten Elicitorpräparaten zeigt diese Gruppe das breiteste Spektrum von Elicitoraktivitäten. Obwohl die verschiedenen Bakterien systematisch nicht weit voneinander entfernt sind, zeigten einige der Präparate gar keine Elicitoraktivität während in anderen Fällen sogar die Aktivität des Standardelicitors überschritten wurde. Da es sich bei allen Präparaten um Zellwandisolate handelt, zeigt das Ergebnis deutlich das Vorhandensein von Substanzen mit Elicitoraktivität in bakteriellen Zellwänden. Dies ergibt sich vor allem aus den Versuchen mit Zellwänden von *Corynebacterium diphtheriae*. Hier wurden drei verschiedene Zellwandpräparate eingesetzt. Zum einen Zellwände, die mit Trypsin behandelt worden waren. Schon dieses Präparat sollte keine Proteine oder Peptide mehr enthalten. Es zeigte mit 137 % der Aktivität des Standardelicitors die höchste überhaupt gemessene, spezifische Elicitoraktivität. Daneben wurde ein Präparat getestet, das nach tryptischem Verdau noch mit SDS behandelt worden war. Die Aktivität dieses Präparats war nur halb so hoch wie die des ersten. Beim dritten getesteten Präparat war nach tryptischem Verdau und SDS-Behandlung noch eine Zuk-kerextraktion mit Formamid vorgenommen worden. Produkt dieser Präparation war ein fast reines Arabinogalaktan. Seine Elicitoraktivität war ebenfalls höher als die des Standardelici-

Liste der getesteten Bakterienzellwände	% Elicitoraktivität im Mikrotest gemessen
Br.butanicum ATCC 21196	18.6
Br.flavum ATCC 13826	15.9
Br.lactofermentum ATCC 13655	43.4
Br.glutamigenes ATCC 13747	113.0
Br.flavum ATCC 14067	30.2
Br.ammoniagenes ATCC 6872	39.5
C.hydrocarboclastum ATCC 15592	7.8
C.nephridii ATCC 11425	123.2
C.paurometab. ATCC 8368	16.4
C.lilium ATCC 15990	108.0
C.striatum ATCC 6940	17.0
C.petrophilum ATCC 19080	0
C.fascians ATCC 12975	26.9
C.fascians 1 (Stolp)	11.0
C.fascians 2 (Stolp)	6.8
C.xerosis ATCC 373 ZW/Tryp	102.0
C.diphtheriae ZW/Tryp	137.0
C.diphtheriae ZW/Tryp/SDS	65.0
C.diphtheria "Arabinogalactan"	133.5

Tab. 6 Elicitoraktivität bakterieller Zellwandpräparate gemessen im Mikrotestverfahren. Der Alkaloidgehalt wurde optisch bestimmt. Die eingesetzte Elicitor-konzentration war 266 mg/l. Der durch die gleiche Menge des ethanolgefällten Hefeelicitors induzierte Alkaloidgehalt wurde als 100 % gewertet. (Br. = Brevibacterium; C = Corynebacterium; ZW = isolierte Zellwände; Tryp = behandelt mit Trypsin; SDS = behandelt mit Natriumdocecylsulfat. Das mit "Arabinogalactan" bezeichnete Präparat wurde nach Zellwandisolation, tryptischem Verdau und SDS Behandlung mit Formamid extrahiert.

Das zuletzt beschriebene Präparat sollte absolut frei von Peptiden oder Proteinen sein.

Neben der optischen Messung des Gehaltes an oxidierten Benzophenanthridinen wurde auch eine HPLC-Analyse vorgenommen. Hierbei zeigte sich (Tabelle 7), daß nach Applikation der hochaktiven bakteriellen Elicitorpräparate in etwa das gleiche Substanzspektrum gebildet wird wie nach Zugabe des Standardelicitors.

gebildet, wird wie nach Zugabe des Standardelicitors. Vor allem fällt auf, daß sich ein nahezu gleiches Produktspektrum für Elicitoren mit gleich starker Aktivität, das heißt, gleich hohem Alkaloidgehalt der Zellkultur ergibt.

Bakterium (Zellwandfraktion)	Substanzgehalt (mg/l)					
(% Elicitorakt.)	A	B	C	D	E	gesamt
Hefeelicator (100)	13	6	44	0	13	76
Br.flavum (16)	0	0	0	0	12	12
C.paurometab.(16)	0	0	0	0	12	12
C.lilium (108)	8	12	36	0	26	82
C.nephridii (123)	27	0	46	0	20	93
C.diphtheriae(137)*	20	0	54	0	31	105
ohne Elicitor(9)	0	0	0	0	7	7

Tab. 7 Produktspektrum der oxidierten Benzophenan-
thridinalkaloide 2 Tage nach Zusatz verschie-
dener bakterieller Zellwandpräparate und des
Hefeelictors. Die Elicitoren wurden in einer
Konzentration von 266 mg/l im Medium verwendet.
A: Sanguinarin; B: Chelerythrin; C: Chelirubin;
D: Chelilutin; E: Macarpin. * verwendet wurde
ein Zellwandpräparat das zusätzlich mit Trypsin
behandelt worden war.

4.2. Wirkung des isolierten Hefepräparates auf Zellkulturen verschiedener Pflanzenarten

Neben der Frage inwieweit andere Elicitoren oder Zuckerpolymere in der Lage sind bei Stamm W der Zellkultur von Eschscholtzia californica die Alkaloidproduktion zu induzieren, ist es wichtig, der Frage nachzugehen, ob auch andere Zellkulturen auf Kontakt mit dem ethanolgefällten Hefeelictor reagieren. Für solche Untersuchungen stand eine große Anzahl von Zellkulturen in der Zellkultursammlung des Instituts zur Verfügung. Die meisten der Kulturen wurden dort routinemäßig als Kalluskulturen erhalten. Es wurde deshalb eine Methode entwickelt, die ein Vorscreening auf der Stufe der Kalluskulturen gestattete. Hierzu wurden Mikrokulturschalen mit 24 Näpfen eingesetzt. Die Thermostabilität und die Löslichkeit des Elicitors gestatteten es, ihn einem mit Agar verfestigten Medium zuzumischen. Die Elicitorkonzentration wurde bei diesem Versuch höher gewählt (1 g/l). Hierfür waren zwei Überlegungen ausschlaggebend. Erstens sollte der geringe Kontakt zwischen dem auf Agarmedium wachsenden Pflanzenkallus und dem im Agarmedium befindlichen Elicitor ausgeglichen werden; zweitens sollten nach Möglichkeit auch solche Kulturen erfaßt werden, deren Reaktion auf den Elicitor schwächer war, als die von Stamm W der Eschscholtzia californica Zellkultur. Von den 24 Näpfen der Mikrokulturschale wurden jeweils 12 mit Normalmedium und 12 weitere mit Medium gefüllt, dem Elicitor zugesetzt war. Von jeder zu testenden Kultur wurden jeweils 3 Kalli auf Normalagar und 3 weitere zum Vergleich auf dem elicitorversetzten Agar angelegt. Zur Kontrolle des Systems wurden auf jeder Kulturschale in gleicher Weise 6 Näpfchen (jeweils 3 mit und 3 ohne Elicitormedium) mit Kalluskulturen von Stamm W besetzt. Als Kriterium für eine Reaktion auf den Elicitor wurde

ein farblicher Unterschied zwischen der Kultur nach dreiwöchigem Wuchs auf Elicitoragar und dreiwöchigem Wuchs auf Normalagar herangezogen. Bei der Auswahl der Kulturen spielten folgende Überlegungen eine Rolle: zum einen sollten nahe verwandte Pflanzen von Eschscholtzia californica getestet werden; zum anderen wurden Pflanzen getestet, die bekanntermaßen Isochinolinalkaloide oder deren Abkömmlinge enthielten. Drittens sollten Pflanzen getestet werden, von denen eine Phytoalexinproduktion als Reaktion auf den Kontakt mit Elicitoren beschrieben war. Tabelle 8 zeigt alle getesteten Kulturen und das Testergebnis. Es wurde eingeteilt in : + = leichte farbliche Veränderung; ++ = deutliche farbliche Veränderungen; +++ = starke farbliche Veränderungen. Es muß betont werden, daß es sich hierbei um ein zu einfaches Kriterium handelt, um eine letzte Aussage über Reaktion oder Nichtreaktion zu machen. Zum einen werden Substanzen ohne Farbe oder Fluoreszenz nicht erfaßt; zum anderen kann aber auch die stark dunkle Farbe einiger Kulturen selbst die Bildung farbiger Substanzen schwer erfaßbar machen. Als Methode für ein Vorscreening einer großen Zahl von Kulturen schien das System trotzdem geeignet. Getestet wurden nach dieser Methode über 200 verschiedene Zellkulturen aus 25 verschiedenen Familien. Starke farbliche Veränderungen als Reaktion auf den Hefeelictor zeigten sich nur im nahen verwandschaftlichen Umfeld der Gattung Eschscholtzia. Vor allem in den Gattungen Glaucium und Chelidonium, die auch zur Familie der Papaveraceae zählen. Daneben treten nennenswerte farbliche Veränderungen nur in den Familien der Berberidaceae und der Ranunculaceae auf. Keine farblichen Veränderungen wurden bei Kulturen beobachtet, deren Phytoalexinproduktion zwar bekannt ist, die aber nicht nahe Verwandte der Papaveraceen sind (z.B. Phaseolus, Pisum etc.).

Getestete Zellkultur	Farbveränderung auf Elicitoragar
----------------------	-------------------------------------

Polygonaceae:

Rheum altaicum	0
Rheum franzenbachii	0
Rheum kialense	0
Rheum officinalis	0
Rheum palmatum	0
Rheum reticulatum	0

Caryophyllaceae:

Agrostemma githago	0
--------------------	---

Chenopodiaceae:

Beta vulgaris	0
---------------	---

Ranunculaceae:

Aconitum japonicum	0
Rannunculus flammula	0
Thalictrum aequilegifolium	0
Thalictrum angustifolium	0
Thalictrum bautrinii	0
Thalictrum bulgaricum	0
Thalictrum calabricum	0
Thalictrum coerulum	0
Thalictrum collinum	0
Thalictrum contortum	0
Thalictrum coreanum	0
Thalictrum delavayi	0
Thalictrum dipterocarpum Bo	+
Thalictrum dipterocarpum Mü	0
Thalictrum dosycarpum	0
Thalictrum glaucum	0
Thalictrum minus	0
Thalictrum petaloideum	0
Thalictrum tuberosum	0

Berberidaceae:

Berberis aggregata	0
Berberis amurensis	0
Berberis angulosa	0
Berberis aristata	0
Berberis beaniana	0
Berberis canadensis	0
Berberis candidula	+
Berberis circumserrata	0
Berberis cratagina	0

Getestete Zellkultur	Farbveränderung auf Elicitoragar
----------------------	-------------------------------------

Berberis dictyophylla	0
Berberis frikartii	0
Berberis gagnepinii	0
Berberis glaucocarpa	0
Berberis gyalatica	0
Berberis henryana	0
Berberis heteropoda	0
Berberis iliensis	0
Berberis julianae	0
Berberis kockiana	+
Berberis lucoides	0
Berberis mucrifolia	+
Berberis notabilis	0
Berberis nummularia	0
Berberis papillifera	+
Berberis paravirescens	+
Berberis polyantha	0
Berberis regeliana	+
Berberis serrata	0
Berberis stenophylla	0
Berberis stolonifera V29	++
Berberis stolonifera V30	+
Berberis taliensis	0
Berberis turcomanica	0
Berberis wilsoniae	+

Menispermaceae:

Cissampelos andromorpha	0
Stephania japonica	0
Tinospora caffra	0

Aristolochiaceae:

Aristolochia elegans	0
Aristolochia grandiflora	0
Aristolochia maxima	0
Aristolochia ridicula	0
Aristolochia rigens	0

Droseraceae:

Drosera burkeana	0
Drosera capillaris	0
Drosera intermedia	0

Papaveraceae:

Adlumia fungosa	0
Argemone alba	0

Getestete Zellkultur	Farbveränderung auf Elicitoragar
----------------------	-------------------------------------

Argemone grandiflora	0
Argemone mexicana	0
Argemone ochroleuca	0
Argemone platyceras	0
Argemone polyanthemus	0
Bocconia cordata	0
Chelidonium franchiatum	+
Chelidonium majus	++
Corydalis aurea	0
Corydalis glauca	0
Corydalis glauca 693	0
Corydalis ophiocarpa 197	+
Corydalis ophiocarpa 198	+
Corydalis ophiocarpa 199	+
Corydalis pallida	0
Corydalis sempervirens	0
Corydalis sempervirens 200	0
Corydalis sempervirens 202	0
Corydalis vaginans 360	0
Corydalis vaginans 703	0
Eschscholtzia californica hell	+++
Eschscholtzia californica dunkel	++
Eschscholtzia douglasii	++
Eschscholtzia glauca	+++
Eschscholtzia lobbii	+++
Eschscholtzia pulchella	+++
Eschscholtzia tenuifolia	+++
Eschscholtzia stenocraspedontae	+
Fumaria capreolata	0
Fumaria officinalis	0
Glaucium corniculatum	0
Glaucium elegans	0
Glaucium flavum	+++
Glaucium rubrum	++
Glaucium vitellum	0
Hypecoum pendulum	0
Macleaya microcarpa	0
Meconopsis grandis	0
Meconopsis napulensis	0
Papaver aculeatum 530	0

Getestete Zellkultur	Farbveränderung auf Elicitoragar
----------------------	-------------------------------------

Papaver atlanticus	0
Papaver bractiatum 155a	0
Papaver caucasicum	0
Papaver feddei	0
Papaver graveolens	0
Papaver graveolens 684	0
Papaver orientale	+
Papaver orientale ziegelrot	+
Papaver orientale Or.Pr.Victoria Louise	0
Papaver orientale cr red crop	+
Papaver orientale 21	0
Papaver orientale 26	0
Papaver orientale 28	+
Papaver orientale 164	+
Papaver pavonium	0
Papaver pseudocanescens	0
Papaver rhacticum	0
Papaver rhoeas	0
Papaver rupifragum	0
Papaver sendtneri	0
Papaver somniferum 68	0
Papaver somniferum 71	+
Papaver somniferum 75	++
Papaver somniferum 89	0
Papaver somniferum 94	0
Papaver somniferum 97	0
Papaver somniferum 98	0
Papaver somniferum 103	0
Papaver somniferum 104	0
Papaver somniferum 106	0
Papaver somniferum 107	0
Papaver somniferum 116	0
Papaver somniferum 162	0
Papaver somniferum Foxtrott	0
Papaver strictum	0
Sanguinaria canadensis	+

Brassicaceae:

Alyssum borzeanum	0
Alyssum desertorum	0
Alyssum markgraffii	0
Alyssum murata	0

Crassulaceae:

Sedum acre	0
------------	---

Getestete Zellkultur	Farbveränderung auf Elicitoragar
----------------------	-------------------------------------

Fabaceae:	
Astragalus preussii	0
Phaseolus multiflora	0
Phaseolus vulgaris	0
Pisum sativum	0
Apiaceae:	
Anethum graveolens	0
Rutaceae:	
Ruta chalepensis	0
Ruta graveolens	0
Ruta montana	0
Asteraceae:	
Arnica montana	0
Artemisia absinthum	0
Artemisia dracunculus	0
Echinacea purpurea	0
Ericaceae:	
Vaccinium vitis	0
Gentianaceae:	
Gentiana lutea	0
Gentiana septemfida	0
Apoacynaceae:	
Catharanthus pusillus	0
Catharanthus roseus	0
Rauvolfia manii	0
Rauvolfia serpentina	0
Rauvolfia verticiliata	0
Tabernaemontana heterophyllum	0
Tabernaemontana contorta	0
Vinca herbacea	0
Vinca major	0
Voacanga africana	0
Rubiaceae:	
Coffea arabica	0
Cinchona ledgeriana	0
Cinchona pubescens	0

Getestete Zellkultur	Farbveränderung auf Elicitoragar
Galium mollugo	0
Rubia tinctorum	0
Laminaceae:	
Mojorana hortensia	0
Ocimum basilikum	0
Solanaceae:	
Capsicum annum	0
Nicotiana alata	0
Nicotiana chinensis	0
Nicotiana glauca	0
Nicotiana rustica	0
Nicotiana sylvestris	0
Nicotiana tabacum 601-1	0
Nicotiana tabacum solanifolia	0
Nicotiana tabacum 24-356	0
Nicotiana tabacum var. xanthi	0
Petunia hybrida	0
Solanum lacinatedum	0
Solanum tuberosum	0
Datura meteloides	0
Datura stromonium var. tatula	0
Loniceraceae:	
Lonicera minutiflora	0
Lonicera morrowii	0
Weigela florida	0
Weigela gigantiflora	0
Weigela japonica	0
Weigela middendorffiana	0
Liliaceae:	
Allium cepa	0
Convolvulaceae:	
Ipomaea violacea	0
Pinaceae:	
Pinus helepensis	0
Pinus pinea	0

Tab. 8 Vorscreening auf farbliche Veränderungen von Zellkulturen nach Wuchs auf elicitorversetztem Festmedium. Die Kalluskulturen wuchsen drei Wochen lang in Näpfen von Multikulturschalen auf Agar, der in einer Konzentration von 1 g/l mit Hefeelicitor versetzt worden war. Verglichen wurde die Farbe dieser Kulturen mit auf Normalagar gewachsenen Kalli. Bewertung: (0) = keine farblichen Veränderungen; (+) = leichte farbliche Veränderungen; (++) = deutliche farbliche Veränderungen; (+++) = starke farbliche Veränderungen.

Alle Kulturen, die in dem Vorscreening mit einer deutlichen farblichen Veränderung auf Kontakt mit dem Elicitor reagiert hatten, wurden nun genauer untersucht. Hierzu wurden zunächst Suspensionskulturen aus den betreffenden Kalli angelegt. Dies geschah in allen Fällen durch Einbringen der Kalli in das entsprechende Flüssigmedium. Nach drei bis vier Wochen Wachstum war in allen Fällen eine ausreichend gute Suspension entstanden. Den Kulturen wurde in der logarithmischen Wachstumsphase, das heißt näherungsweise in der Mitte der Zeit bis zur nächsten Passage in frisches Medium, Elicitor in einer Konzentration von 500 mg/l zugesetzt. Auch diesmal wurde also die Elicitorkonzentration höher gewählt als beim Standardtest mit Stamm W. Um sicherzustellen, daß auch geringfügige Reaktionen auf den Elicitor gemessen werden konnten, wurde darüberhinaus auch eine längere Einwirkzeit des Elicitors, nämlich 4 Tage zugelassen. Nach den vier Tagen wurden die Kulturen durch Vakuumfiltration abgeerntet. 4 g frisches Gewebe wurde mit 30 ml EtOH/HCl(0.1N)=80/20 für 2 Stunden am Rückfluß extrahiert. Der Extrakt wurde anschließend auf ungefähr 10 ml eingeeengt und mit der HPLC auf seine Inhaltsstoffe analysiert. Aus einer Parallelanalyse einer nicht mit Elicitor behandelten Kultur waren Veränderungen im Sekundärstoffwechsel anhand des

Peakmasters leicht zu erkennen.

Die Identifikation einer Substanz aus einem Pflanzenextrakt dessen Inhaltsstoffe unbekannt sind nur anhand der Retentionszeit in einem bestimmten HPLC-Trennsystem schien aber wenig schlußkräftig zu sein. Es wurde daher vom bekannten analytischen HPLC-System ausgehend ein weiteres präparatives zur Isolation der Substanzen ausgearbeitet. Grundlage dieses präparativen HPLC-Systems waren die gleichen Laufmittel, das gleiche Säulenmaterial und der gleiche, programmierte Laufmittelgradient. Es wurde allerdings diesmal eine Säule mit einem Durchmesser von 16 mm verwendet. Um bei Verwendung der gleichen Laufmittelsysteme und des gleichen Gradienten in etwa gleiche Retentionszeiten für die oxidierten Benzophenanthridinalkaloide zu erhalten, wurde die Flußrate variiert. Es zeigte sich, daß eine Flußrate von 9 ml/min zu Ergebnissen führte, die den analytischen HPLC-Läufen entsprach. Zur Isolation der Substanzen wurde das Laufmittel nach der Säule zeitprogrammiert in Fraktionen aufgefangen. In der Regel wurde eine Fraktionierungszeit von einer Minute gewählt. Zur schonenden Isolation der Substanzen aus dem phosphorsauren Wasser-Acetonitril Gemisch wurde dieses zunächst im Volumenverhältnis 1:1 mit Wasser verdünnt. Die Fraktionen (das Volumen war jetzt ungefähr 20 ml) wurden danach über kleine Säulchen, die mit RP-8 Material gefüllt waren, gegeben (Säulenabmessungen: 1.11 cm x 0.5 cm, verwendet wurden hierfür Pasteur-Pipetten, die mit Seesand und Watte abgedichtet waren). Die Substanzen wurden also in einer Lösung mit einem deutlich höheren Wassergehalt als ihre Elutionslösung bei der HPLC wieder an RP-Material adsorbiert. Die adsorbierten Substanzen konnten nun mit einer möglichst kleinen Menge MeOH von den Säulchen wieder eluiert werden. Zur Elution der oxidierten Benzophenanthridine mußte das Methanol leicht angesäuert werden. Die so erhaltenen Lösungen

wurden unter Stickstoff vorsichtig zur Trockne eingeblasen und anschließend mit dem Massenspektrometer analysiert.

Zunächst wurden verschiedene Arten der Gattung Eschscholtzia mit der beschriebenen Methode getestet. Tabelle 9a zeigt zunächst die optisch gemessene Erhöhung des Gehaltes ab oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden. Tabelle 9b gibt eine Analyse der Produktsammensetzung. In allen Fällen kommt es zu einer Steigerung des Gehaltes an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden. Bemerkenswert ist weiterhin, daß im Falle von Eschscholtzia lobbii fast ausschließlich Macarpin gebildet wird.

Danach wurden weitere Zellkulturen getestet, die im Vorscreening positiv reagiert hatten. 1984 berichteten EILERT et al. von einer Induktion der Sanguinarinproduktion durch Zellkulturen von Papaver somniferum. Am Institut standen mehrere variante Zellkulturstämmen dieser Pflanze zur Verfügung. Im Vorscreening zeigten nur zwei Stämme nach Wuchs auf Elicitoragar Farbunterschiede zu den Normalstämmen. Sie trugen die Bezeichnungen ST 71 und ST 75. Von diesen Stämmen wurden Suspensionen angelegt. Die Suspensionskulturen wurden in 300 ml Erlenmeyerkolben, die 75 ml LS-Medium enthielten angezogen. Diese wurden mit 5 g frischen Zellen angeimpft. Nach einer Woche Wuchs wurden je zwei Kolben mit 40 mg Hefeelictor in 4 ml LS-Medium gelöst versetzt. Wie beschrieben wurden nach weiteren 4 Wuchstagen die Zellen durch Vakuumfiltration vom Medium getrennt und 4 g frisches Gewebe mit 30 ml EtOH/HCl (80/20) extrahiert. Bei der anschließenden HPLC-Analyse zeigte sich, daß im Fall von Stamm 71 die Elicitorzugabe nicht zu einer Erhöhung des Sanguinaringehaltes führte. Er betrug optisch gemessen (E_{490}) 10.9 mg/l bei der Normalkultur und 9.3 mg/l bei der mit Elicitor versetzten. Bei Stamm 75 ergab sich jedoch eine Steigerung des

Art	Gehalt an ox.Benzophenanthridinen(mg/l)	
	(-) Elicitor	(+) Elicitor
E.caespitosa	7.7	10.0
E.californica-Tyr	32.1	79.9
E.douglasii	22.0	41.0
E.glauc	41.2	169.0
E.lobbii	12.9	129.0
E.pulchella	7.9	16.9
E.tenuifolia	6.7	28.0

Tab. 9 a Gehalt an oxidierten Benzophenanthridin-alkaloiden bei verschiedenen Arten der Gattung Eschscholtzia mit und ohne Elicitor (500 mg/l) im Kulturmedium. Anzucht der Kulturen erfolgte in 300 ml Erlenmeyerkolben. Ernte und Extraktion des Gewebes 4 Tage nach Elicitorzusatz.

Art	Gehalt an ox.Benzophenanthridinen(mg/l)					
	A	B	C	D	E	gesamt
E.caespitosa	2.7	2.1	5.2	0	12.2	10.0
E.califor.-Tyr	0	23.0	52.0	0	4.9	79.9
E.douglasii	25.2	0	22.0	0	3.8	41.0
E.glauc	0	73.4	80.1	0	15.6	169.0
E.lobbii	0	3.5	7.6	0	118.0	129.0
E.pulchella	1.8	4.0	0.9	0	10.2	16.9
E.tenuifolia	4.3	2.6	8.9	0	12.2	28.0

Tab. 9 b Produktspektrum an ox.Benzophenanthridinalkaloiden bei verschiedenen Arten der Gattung Eschscholtzia nach Induktion ihrer Bildung durch den ethanolgefällten Hefeelicitor (Konz. = 500 mg/l). Die Anzucht der Kulturen erfolgte in 300 ml Erlenmeyerkolben. Ernte und Extraktion des Gewebes erfolgte 4 Tage nach Elicitorzugabe. A=Sanguinarin; B=Chelerythrin; C=Chelirubin; D=Chelilutin; E=Macarpin.

Sanguinaringehaltes von 3.8 mg/l auf 25 mg/l. Im Falle dieser Kultur wurde Sanguinarin als einzige Substanz induziert gebildet.

Andere Kulturen mit deutlich positiver Reaktion auf Elicitorkontakt im Vorscreening waren Chelidonium und Glaucium Arten. Das Auftreten von Benzophenanthridinalkaloiden in den differenzierten Pflanzen dieser Arten war bereits 1955 von SLAVIK et al. (1955 a,b,c,d) beschrieben worden. Der Test erfolgte ebenso wie für die Kulturen von Papaver somniferum beschrieben. Die Kulturen wurden wieder in 75 ml Medium angezogen. Zugabe des Elicitors erfolgte wieder eine Woche nach dem Animpfen der Kultur mit 5 g frischen Zellen. Nach 4 Tagen erfolgte Ernte und Extraktion der Zellen. Im Falle der Kultur von Glaucium flavum stieg der Gehalt an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden von 23.4 mg/l (17.2 g/l Trockengewicht) bei einer Kultur ohne Elicitorzusatz auf 74.5 mg/l bei einer Kultur, deren Medium 4 Tage zuvor Elicitor zugesetzt worden war (18.4 g/l Trockengewicht). Gebildet wurden zu 72 % Sanguinarin und zu 28 % Chelirubin (Nachweis durch MS). Bei einer Kultur von Glaucium rubrum erhöhte sich der Alkaloidgehalt durch Elicitorzusatz zum Medium von 27.4 mg/l (16.3 g/l Trockengewicht) auf 88.6 mg/l (15.4 g/l Trockengewicht). Gebildet wurden hier Sanguinarin zu 63 % und Chelirubin zu 37 %. In beiden Fällen wurde das Auftreten von Dihydrobenzophenanthridinalkaloiden nicht beobachtet. Im Rahmen der bei der Meßmethodik und der Kulturanzucht auftretenden Schwankungen kann man die Reaktion dieser beiden Kulturen verschiedener Glaucium Arten als fast identisch ansehen.

Eine in gleicher Weise getestete Zellkultur der (ebenfalls nah mit der Gattung Eschscholtzia) verwandten Pflanze Chelidonium majus reagierte auf Elicitorzusatz mit einer Steigerung des Alkaloidgehaltes von 23.8 mg/l auf 80 mg/l. In diesem Fall wurden

allerdings nicht Sanguinarin und Chelirubin sondern Sanguinarin (60 %) und Chelerythrin (40 %) gebildet. Wie bei Glaucium traten auch hier keine Dihydroverbindungen auf.

Außer bei diesen konnte eine Bildung von Sanguinarin nach Elicitorzugabe zum Medium noch bei einer Zellkultur der Pflanze Corydalis ophiocarpa gemessen werden. In diesem Fall steigt der Sanguinaringehalt bei Zugabe von Elicitor ins Kulturmedium um 6.2 mg/l von 8.3 mg/l auf 14.5 mg/l. Das Auftreten von Sanguinarin und ähnlicher Benzophenanthridinalkaloide ist auch bei differenzierten Pflanzen innerhalb dieser Gattung beschrieben.

Neben diesen Kulturen wurden außerdem noch Kulturen von folgenden Pflanzen getestet: Berberis aristata, Berberis stolonifera, Stephania japonica. Bei keiner dieser Kulturen konnte die verstärkte Bildung von Sekundärmetaboliten nach Elicitorzugabe zum Kulturmedium beobachtet werden.

5. Untersuchungen zur Physiologie der induzierten Alkaloidbildung bei Eschscholtzia californica

5.1. Benzophenanthridinbildung bei etiolierten Keimlingen von Eschscholtzia californica

Die klassischen Beispiele der Phytoalexinbildung entstammen einer ökologischen Forschungsdisziplin, der Phytopathologie, und wurden bei differenzierten Pflanzen entdeckt (MÜLLER 1941). Bis auf die Bildung der Avenalumine bei Hafer (MAYAMA et al. 1981) wurden aber alle Beobachtungen einer induzierten Alkaloidbildung aus jüngster Zeit an Zellkulturen gemacht (WOLTERS und EILERT 1982, WINK und WITTE 1983b, EILERT et

al. 1984, BRODELIUS et al. 1986). Da die Sekundärstoffproduktion pflanzlicher Zellkulturen aber auch durch ganz unspezifische Faktoren wie Erhöhung des Saccharosegehaltes im Medium (ZENK und DEUS 1982, SCHÜBEL 1984) oder durch Zusatz von Pflanzenhormonen (TABATA et al. 1971, ZENK et al. 1975) gesteigert werden kann, schienen Zweifel am wirklichen Phytoalexincharakter dieser Alkaloide möglich. Es sollte daher überprüft werden, ob eine ähnliche Steigerung des Alkaloidgehaltes nach Elicitoreinwirkung, wie bei den Zellkulturen, auch bei der differenzierten Pflanze beobachtet werden konnte. Die Messung des Alkaloidgehaltes in der Ganzpflanze hatte ergeben, daß ihre Wurzel in hohem Maß Benzophenanthridine enthielten (1.6 % des Trockengewichts gegenüber 0.29 % bei Stamm W) insbesondere Sanguinarin (55 %) und Chelerythrin (45 %). Der Benzophenanthridingehalt der oberirdischen Pflanzenteile ist allerdings geringer (0.03 % des Trockengewichts). Diese oberirdischen Teile der Pflanze schienen daher geeignet zu untersuchen, ob auch bei Ganzpflanzen von Eschscholtzia californica eine Elicitor-induzierte Alkaloidbildung auftreten kann. Es wurde bereits geschildert, daß autoklaviertes Pilzmycel vieler verschiedener Pilze die Induktion der Alkaloidbildung in der Zellkultur auslöste. Es schien daher notwendig, den geplanten Versuch mit keimfrei angezogenen Pflanzen durchzuführen. Wegen der leichten Detektierbarkeit der Alkaloide aufgrund ihrer intensiven Farbe schien es weiterhin günstig, den Versuch mit den Stengeln etiolierter Keimlinge durchzuführen. Dieses System bot darüberhinaus den Vorteil der leichten Bereitstellung ausreichender Mengen an Versuchsmaterial.

Zur Anzucht der Keimlinge wurden Samen von Eschscholtzia californica aus eigener Ernte benutzt. Sie wurden zunächst durch eine 10 minütige Behandlung mit Natriumperchloratlösung (5 %) sterilisiert. An-

schließlich wurden sie zur Auskeimung unter sterilen Bedingungen auf Petrischälchen mit Wasseragar (10 % Agar) aufgebracht. Nach etwa vier Tagen in Dunkelheit war die Mehrzahl der Samen ausgekeimt. Nach weiteren vier Tagen Wachstum unter Lichtausschluß wurden die Keimlinge für die Versuche herangezogen. Um die Alkaloidbildung in den weißen Stengeln zu untersuchen wurden diese durch Einstechen einer sterilen Nadel verletzt. Danach wurde auf die verletzte Stelle ein Tropfen einer Elicitorlösung (10 g/l) aufgebracht. Nach einigen Tagen zeigte sich an den Verletzungsstellen eine deutlich rote Färbung (siehe Abb. 18).

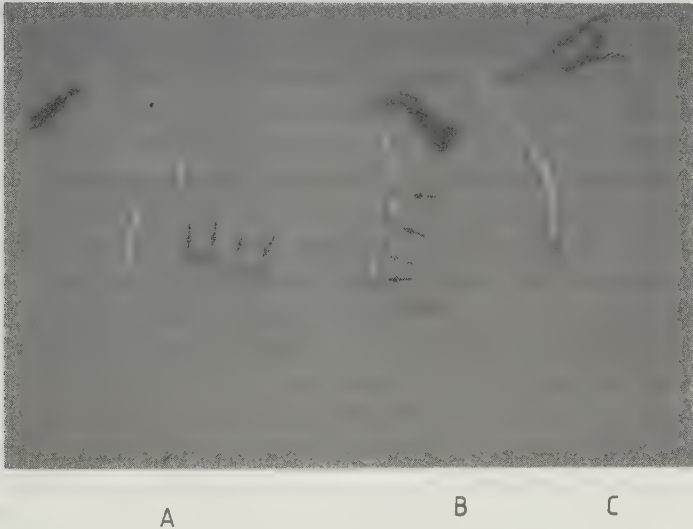


Abb. 18 Die Abbildung zeigt acht Tage alte etiolier-
te Keimlinge von Eschscholtzia californica. Die
Keimlinge A und B waren vier Tage zuvor an den
durch Pfeile markierten Stellen mit einer Nadel
verletzt worden. Keimling C wurde nicht verletzt.
Anzucht und Verletzung der Keimlinge erfolgte
unter sterilen Bedingungen auf Petrischalen mit
10 prozentigen Wasseragar.

Zur chemischen Analyse der gebildeten Substanzen wurden die roten Bereiche der Sproßachse ausgeschnitten und in EtOH/HCl (5 ml) extrahiert. Verwendet wurden die Keimlinge eine Woche nach erfolgter Verletzung. Parallel wurden rein weiße Sproßstücke unverletzter Keimlinge in gleicher Weise extrahiert. Optisch gemessen ergab sich für die unverletzten Sproßstücke ein Benzophenanthridingehalt von 0.05 % des Trockengewichts. Für die verletzten wurde eine Steigerung auf 0.23 % ermittelt. Hierzu muß angemerkt werden, daß schon zur Erzielung der hier extrahierten Menge von 80 mg eine Vielzahl von Sproßstückchen nötig waren. Unterschiedliche Keimlinge reagierten aber verschieden stark, und zudem verblieben beim Ausschneiden der Sproßstückchen auch noch weiße Sproßbereiche an den Proben, die mitextrahiert wurden. Die Alkaloidkonzentration im Zentrum der roten Flecken dürfte also höher sein.

Eine anschließende Analyse des gebildeten Produktspektrums mit der HPLC ergab, daß die roten Sproßstückchen zu 8.5 % Sanguinarin; 19.8 % Chelerythrin; 38.6 % Chelirubin und zu 32.9 % Macarpin enthielten. Anzumerken ist, daß ein solches Produktspektrum, insbesondere ein so hoher Gehalt an Macarpin, noch nie für eine Ganzpflanze von Eschscholtzia californica oder Teile davon beschrieben worden ist (vergl. Kapitel III. 1.4. und SLAVIK und SLAVIKOVA 1955b), daß dieses Produktspektrum aber durchaus dem ähnelt, das die Zellkulturen von Stamm W nach Einwirken des Elicitors zeigen.

Bei mehrmaliger Wiederholung des Versuchs erwies sich aber auch, daß der gezeigte Effekt in gleicher Weise eintrat, wenn nur eine Verletzung der Keimlinge, ohne Zusatz von Elicitor erfolgte. Der Elicitorzusatz bewirkte nicht einmal eine Steigerung des Effektes. Nicht verletzte Keimlinge zeigten niemals die Ausbildung derartiger roter Flecken im Bereich

der Sproßachse.

Eine interessante Parallele stellt eine Beobachtung von WINK (1983a) dar. Er stellte eine gesteigerte Bildung von Chinolizidin Alkaloiden bei Lupinenblättern nach Verwundung fest.

5.2. Induzierte Benzophenanthridinbildung durch Zellkulturen (Stamm W) bei Calciumverarmung

Von verschiedenen Beispielen für die Akkumulation von Phytoalexinen ist bekannt, daß Calcium-Ionen für die Wirkung von Elicitoren von Bedeutung sind (KAUSS 1986). Auch in unserem Fall wurde deshalb untersucht, ob eine Calciumverarmung Einfluß auf die Höhe der akkumulierten Menge an Benzophenanthridinalkaloiden hat. Eine Calciumverarmung kann bei den Zellkulturen auf drei Wegen erreicht werden. Im einfachsten Fall kann die Zugabe von Calcium-Ionen zum Kulturmedium unterbleiben. Darüberhinaus können Calcium-Ionen durch eine Komplexbildung mit EDTA dem Medium entzogen werden. Schließlich können Calcium-Kanäle durch Lanthan-Ionen verlegt werden. Um die Überlagerung anderer Effekte auszuschließen, wurden hier alle drei Wege beschritten. Zunächst wurden Kulturen in Calcium-freiem Medium für eine Woche angezogen. Die in diesem Fall verbleibende Restmenge an Calcium-Ionen im Gewebe oder in geringen Mengen des alten Kulturmediums, das in das frische Medium eingetragen wird, verhindert aber ein völliges Fehlen von Calcium-Ionen.

Nach einer Woche Wuchs in dem Calcium-freien Medium wurden 300 ml Erlenmeyerkolben, die 75 ml ebenfalls Calcium-freies Medium enthielten, mit 10 g des frischen Calcium-verarmten Gewebes angeimpft. Nach 12 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von LaCl_3 und EDTA in einer Endkonzentration von 4 mM im Medium

zu jeweils 4 Kolben. Zur Kontrolle wurden weiteren 4 Kolben CaCl_2 in gleicher Konzentration zugesetzt. Nach 12 weiteren Stunden Inkubation wurde je zwei Kolben zusätzlich Elicitor zugegeben. Nach 48 Stunden wurde das Gewebe durch Vakuumfiltration geerntet und nach Extraktion der Gehalt an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden optisch bestimmt. Verglichen wurde anschließend der Alkaloidgehalt einer Kultur ohne Zusatz, einer Kultur 48 Stunden nach Zusatz des Hefeelicitors (250 mg/l), einer Kultur nach Zusatz von Hefeelicitor und CaCl_2 , einer Kultur nach Zusatz von Hefeelicitor und EDTA bzw. LaCl_3 sowie Kulturen, denen nur EDTA bzw. LaCl_3 aber kein Hefeelicitor zugesetzt worden war. Der gleiche Versuch wurde noch einmal durchgeführt mit Kulturen, die nicht auf Calcium-freiem sondern auf normalem LS-Medium gewachsen waren. Hierdurch sollte festgestellt werden, ob im ersten Versuch beobachtete Effekte auf einer Schädigung der Kultur durch die vorangehende Calciumverarmung zurückgeführt werden mußten. (Versuchsergebnisse siehe Abbildung 19). Es zeigt sich, daß der Zusatz von LaCl_3 und EDTA die Induktion der Alkaloidbildung durch Elicitorzusatz zum Kulturmedium unter den beschriebenen Bedingungen nicht völlig unterdrückt, aber doch stark herabsenkt. Der Effekt ist stärker bei Verwendung von Calcium-freiem Medium, aber bei Verwendung von Normalmedium ebenfalls zu beobachten. Der Zusatz von EDTA und LaCl_3 allein, ohne Elicitor, verändert in beiden Fällen den normalen Alkaloidgehalt der Kultur nicht. Interessant ist ebenfalls, daß bei vorherigem Zusatz von CaCl_2 zum Calcium-freien Medium und anschließendem Elicitorzusatz der Induktionseffekt stärker, ist als bei Elicitorzugabe ohne CaCl_2 .

Die Bedeutung von Calcium für die Wirkung ist also in unserem Fall ebenso gegeben, wie für das System der Sojabohne (KAUSS 1986), obwohl dort wirksame Eli-

citoren hier nur einen geringen Effekt zeigen (vergl. Chitosan Effekt in Kapitel III. 4.1.2). Der Umstand, daß Lanthan-Ionen die Elicitorwirkung noch stärker hemmen als EDTA, deutet auch in diesem Fall auf einen Calcium-Einstrom in die Zelle hin.

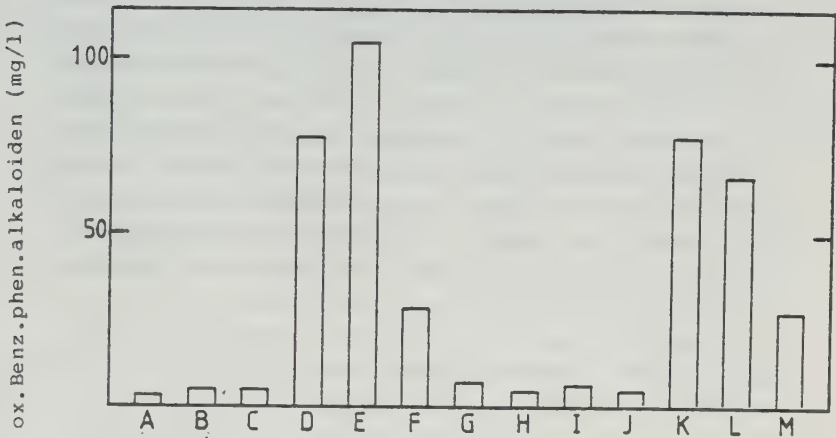


Abb. 19 Akkumulation von oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden nach Calcium Verarmung. Getestet wurde in 300 ml Erlenmeyerkolben mit 75 ml Medium. 48 Stunden nach Elicitorzugabe wurden die Zellen durch Vakuumfiltration geerntet und der Gehalt an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden optisch bestimmt. A - G Kulturmedium enthielt kein Calciumchlorid; H - M Normales LS-Medium; Darüberhinaus war dem Kulturmedium zugegeben: A: Kontrolle ohne Elicitor; B: Kontrolle ohne Elicitor, mit Calciumchlorid (4 mM); C: Kontrolle ohne Elicitor, mit Lanthanchlorid (4 mM); D: mit Hefeelicitor (250 mg/l); E: mit Hefeelicitor (250 mg/l), mit Calciumchlorid (4 mM); F: mit Hefeelicitor (250 mg/l) mit EDTA (4 mM); G: mit Hefeelicitor (250 mg/l) mit Lanthanchlorid (4 mM); H: Kontrolle ohne Elicitor; I: Kontrolle ohne Elicitor, mit EDTA (4 mM); J: Kontrolle ohne Elicitor, mit Lanthanchlorid (4 mM); K: mit Hefeelicitor (250 mg/l); L: mit Hefeelicitor (250 mg/l), mit EDTA (4 mM); M: mit Hefeelicitor (250 mg/l), mit Lanthanchlorid (4 mM).

5.3. Untersuchungen zum Zusammenhang von Alkaloid-
akkumulation und Ethylenbildung bei Stamm W
von Eschscholtzia californica

Von der Induktion der Ethylenbiosynthese bei Zellkulturen von Petroselinum hortense nach Zugabe eines Elicitors aus Phytophthora megasperma berichten CHAPPELL et al. 1984. Ethylen stellt ein Pflanzenhormon mit recht unterschiedlichen Wirkungen in verschiedenen Wuchsstadien von Pflanzen dar. Es wird auch als Reaktion auf Gewebsverletzung gebildet. Seine Biosynthese erfolgt ausgehend von L-Methionin über S-Adenosylmethionin, aus dem katalysiert durch die ACC-Synthase 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) gebildet wird. Aus dieser Substanz entsteht über weitere Reaktionen das Ethylen (siehe Abbildung 20).

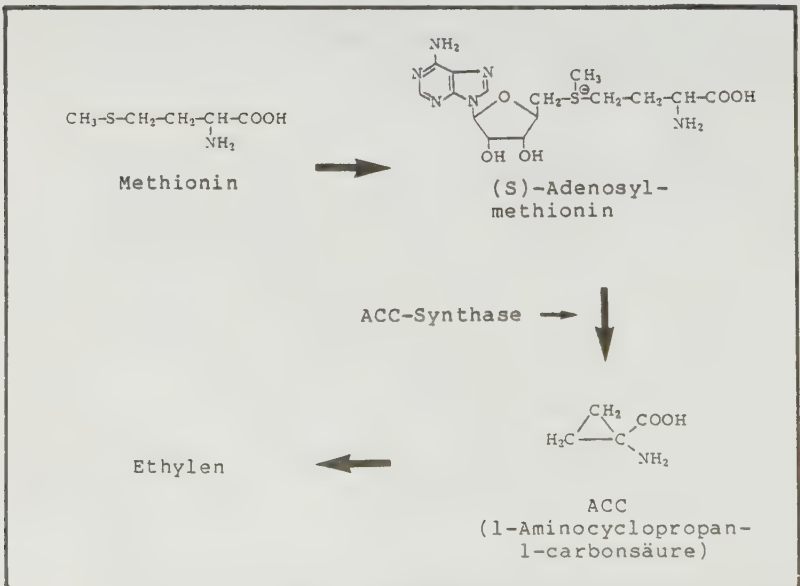


Abb. 20 Grobes Biosyntheseschema des Pflanzenhormons Ethylen.

CHAPPELL et al. (1984) beschrieben nicht nur die Induktion der Ethylenbildung, sondern wiesen auch die Induktion einer ACC-Synthaseaktivität und die Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase, sowie einer Chitinaseaktivität nach. Sie zeigten außerdem, daß die ACC-Synthasereaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Ethylenbiosynthese ist. Unklar bleibt allerdings, ob die Induktion der Phytoalexinbildung und die Induktion der Ethylenbiosynthese notwendig verbunden sind. Infolgedessen sollte auch für das hier beschriebene System untersucht werden, ob eine Induktion der Ethylenbiosynthese mit der Alkaloidakkumulation parallel verläuft. Untersucht wurde die Bildung von Ethylen, ACC, Malonyl-ACC, einer Speicherform des ACC, und der ACC-Synthase.

Für die Messung des ACC bzw. Malonyl-ACC Gehaltes wurden Kulturen in 300 ml Erlenmeyerkolben (75 ml Medium) mit 4 g frischem Gewebe angeimpft. Nach 10 Wuchstagen wurden die Kulturen mit dem Hefeelicitator versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Elicitorzugabe wurde das Gewebe durch Vakuumfiltration abgeerntet. 5 g des Gewebes wurden mit 40 ml Ethanol (80 %) für 1 Stunde am Rückfluß extrahiert. Das Gewebe wurde nun bei 10 000 g abzentrifugiert und der ethanolische Überstand unter Vakuum zur Trockne eingengt. Der trockene Rückstand wurde in 4 ml Wasser wieder aufgenommen. Der unlösliche Rückstand wurde wieder abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die zu messende Substanz. Der ACC Gehalt wurde nach dem Verfahren von LIZADA und YOUNG (1979) also durch Umsetzung zu Ethylen und gaschromatographischen Nachweis desselben durchgeführt. Zur Bestimmung des Malonyl-ACC wurden die ethanolischen Extrakte nicht in Wasser, sondern in HCl aufgenommen. Nach salzsaurer Hydrolyse des Malonyl-ACC wurde wiederum der ACC Gehalt nach LIZADA und YOUNG (1979) bestimmt. Aus der

Differenz des ACC Gehaltes vor und nach der sauren Hydrolyse ergibt sich der Gehalt an Malonyl-ACC. Ebenfalls bestimmt wurde der Gehalt an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden zu den Zeitpunkten nach Elicitorzugabe. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis des Tests.

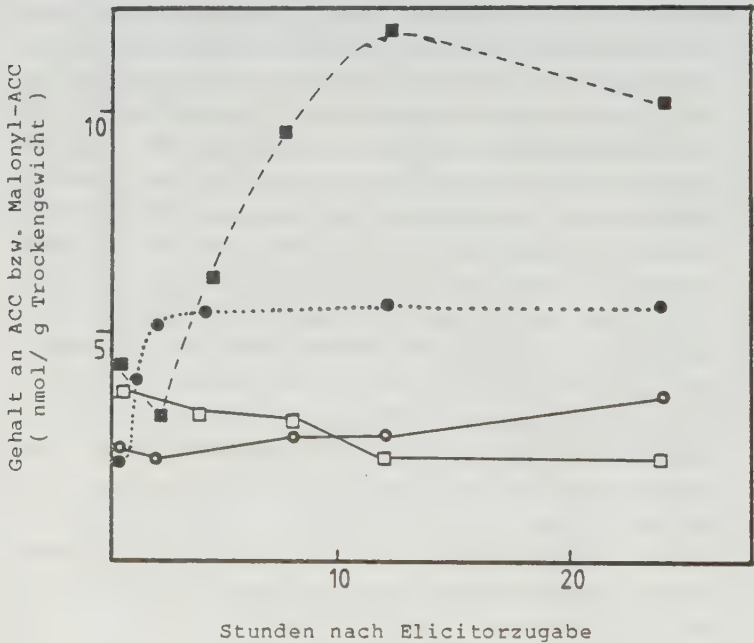


Abb. 21 Gehalt an ACC und Malonyl-ACC Gehalt 48 h nach Zugabe von Hefeelicitor bzw. ohne Elicitorzugabe bei Stamm W einer Zellkultur von *Eschscholtzia californica*. Das Gewebe wurde nach Ernte durch Vakuumfiltration mit Ethanol (80 %) extrahiert. Der ACC bzw. Malonyl-ACC Gehalt wurde nach LIZADA und YOUNG (1979) bestimmt.
ACC Gehalt (O) bei Kulturen ohne Elicitorzusatz; Malonyl-ACC Gehalt (□) bei Kulturen ohne Elicitorzusatz; ACC Gehalt (●) bei Kulturen nach Elicitorzugabe (250mg/l); Malonyl-ACC Gehalt (■) bei Kulturen nach Elicitorzusatz (250 mg/l)

Auch 24 Stunden nach Elicitorzugabe ist es demzufolge nur zu einer unwesentlichen Erhöhung des Malonyl-ACC Gehaltes und kaum zu einer Erhöhung des ACC Gehaltes gekommen. Insgesamt sind die gemessenen ACC Konzentrationen sehr viel geringer als die von CHAPPELL et al. (1984) gemessenen.

Zur Messung der Ethylenbildung durch die Zellkulturen wurden 100 ml Erlenmeyerkolben die 25 ml LS-Medium mit 1 g frischen Zellen von Stamm W angeimpft. Die Kolben wurden mit Serumstopfen gasdicht verschlossen. Nach 12 Stunden Inkubation wurde den Kolben Hefeelicitor bis zu einer Endkonzentration von 250 mg/l im Medium zugegeben. Zu bestimmten Zeiten nach Elicitorzugabe wurde den Kolben mit einer Spritze 1 ml Gasvolumen entnommen. Der Ethylengehalt im entnommenen Probenvolumen wurde gaschromatographisch bestimmt (siehe Kapitel II. 2.1.5.). Parallel wurden auch Kolben, denen kein Elicitor zugegeben worden war, die entsprechende Gasmenge entnommen. Andere parallel wachsende Kulturen wurden dazu verwendet, den Gehalt an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden mit und ohne Elicitor im Medium zu bestimmen. Abbildung 22 zeigt das Versuchsergebnis. Obwohl in dem beobachteten Zeitraum die Alkaloidproduktion bei den Kulturen, denen Elicitor zugesetzt worden ist, bereits beginnt, zeigt sich keinerlei erhöhte Ethylenproduktion. Der Versuch wurde in gleicher Weise aber auch mit Kulturen durchgeführt, denen in einer Endkonzentration von 1 mM ACC zugesetzt worden war. Es zeigt sich, daß der Zusatz von ACC zu einer deutlich meßbaren Ethylen-Produktion. In diesem Fall allerdings wird von den Kulturen ohne Elicitorzusatz genausoviel Ethylen gebildet wie von den Kulturen denen zur Kontrolle kein Elicitor zugegeben worden war (siehe Abbildung 22).

Es wurde auch versucht, in Gewebe, das in Medium mit und ohne Elicitorzusatz angezogen worden war,

ACC-Synthase nachzuweisen. Die Isolierung wurde nach dem von CHAPPELL et al. (1984) beschriebenen Verfahren durchgeführt. In keinem Fall konnte allerdings eine Enzymaktivität gemessen werden.

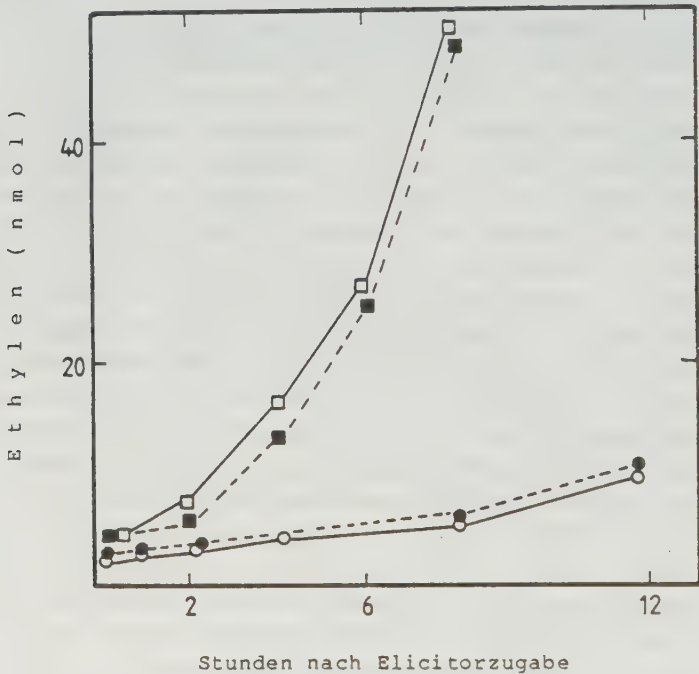


Abb. 22 Ethylenbildung von Zellkulturen von Stamm W bei Wuchs mit und ohne Elicitor im Medium. Die Kulturen wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml LS-Medium (Inoculum 1 g) angezogen. Sie waren verschlossen mit gasdichten Serumstopfen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde 1 ml Gasvolumen entnommen. Der Versuch wurde wiederholt mit Zufütterung von ACC (Endkonzentration 1 mM). (○) Ethylenbildung der Kultur ohne Elicitorzusatz; (●) Ethylenbildung der Kultur nach Zusatz des Hefeelicitors (250 mg/l); (□) Ethylenbildung der Kultur ohne Elicitorzusatz, aber nach Zusatz von ACC; (■) Ethylenbildung der Kultur nach Zusatz von Hefeelicitor (250 mg/l) und ACC.

Die erzielten Ergebnisse zeigen deutlich Besonderheiten des hier beschriebenen Systems. Obwohl eine Akkumulation von Substanzen stattfindet, die wohl als Phytoalexine angesprochen werden müssen, zeigt die Ethylenbiosynthese keine Reaktion auf den zugesetzten Elicitor.

5.4 Induktion von Enzymaktivitäten bei Stamm W nach Zusatz von Hefeelicitor zum Kulturmedium

5.4.1. Enzyme aus der Biosynthese der Protoberberin- alkaloide

Über die Biosynthese der Benzophenanthridinalkaloide liegen nur wenige Untersuchungen vor. Ihre Entstehung aus Protoberberinvorstufen wurde zuerst von ROBINSON (1955) postuliert. Gestützt wurden diese Vorstellungen durch Fütterungsexperimente von LEETE und MURRILL (1964) und insbesondere von BATTERSBY et al. (1965 und 1967). Battersby konnte zeigen, daß radioaktiv markiertes Retikulin, Scoulerin und Stylopin bei Fütterung an die Pflanze Chelidonium majus in das Benzophenanthridinalkaloid Chelidonin eingebaut werden. TAKAO et al. veröffentlichten 1983 interessante Experimente, die den Weg von den Protoberberinen zu den Benzophenanthridinalkaloiden klären sollten. Sie stellten fest, daß nach Fütterung von (-)-(S)-7,8,13,13a-Tetrahydroberberin die Alkaloide Chelerythrin, Allocryptopin und Berberin gebildet werden, während aus dem (R)-Enantiomer nur Berberin und Dihydroberberin entstehen. Schließlich konnten sie den Einbau von (R,S)-cis-N-¹³CH₃-7,8,13,13a-Tetrahydroberberin-Chlorid in Chelerythrin und Allocryptopin messen.

Die hier beobachtete Entstehung von Berberin aus

(R)-Tetrahydroberberin steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von AMANN (1986), der feststellte, daß die (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase nur die (S)-Enantiomere der Tetrahydroprotoberberine umsetzt.

Enzymatische Untersuchungen zur Benzophenanthridinbiosynthese gibt es derzeit nicht. Die am Institut entwickelten Enzymtestverfahren zur Aufklärung der Biosynthese der Protoberberine, insbesondere des Berberins, können aber auch auf die Untersuchung der Biosynthese der Benzophenanthridine angewendet werden. Mit Hilfe dieser Enzymtests kann also untersucht werden, ob der Elicitorzusatz zu einer Steigerung der Enzymaktivitäten dieses Biosyntheseweges in den Zellkulturen von Eschscholtzia führt. Eine solche Untersuchung kann auch zeigen, auf welcher Stufe der Alkaloidbiosynthese die Induktion einsetzt.

Die von dem Enzym (S)-Norlaudanolin-Synthase katalysierte Reaktion liegt biosynthetisch gewissermaßen an der Schnittstelle von Primär- und Sekundärstoffwechsel. Zur quantitativen Messung der von diesem Enzym katalysierten Umsetzung von Dopamin und Dihydroxyphenylacetaldehyd wurde am Institut ein Testverfahren entwickelt, das die Freisetzung eines Tritium-Atoms aus radioaktiv markiertem Dopamin ins wäßrige Medium nutzt (RÜFFER et al. 1981). Mit diesem Testsystem wurde aus Eschscholtzia tenuifolia ein solches Enzym gereinigt, das para-Hydroxyphenylacetaldehyd ebenfalls als Substrat akzeptiert (SCHUMACHER et al. 1983). Mit Hilfe des Testverfahrens wurde untersucht, ob Kulturen, die mit dem Hefeelicator versetzt waren, eine höhere katalytische Aktivität dieses Enzyms aufwiesen. Verwendet wurden als Substrate sowohl der di-, als auch der monohydroxylierte Aldehyd. Das Enzymtestverfahren ist in Kapitel II. 2.3.1. beschrieben.

Ein weiteres Enzym aus dem Biosyntheseweg der Protoberberinalkaloide, die Vorstufen der Benzophe-

nanthridine sind, ist die S-Adenosylmethionin: (R,S)-Norretikulin-N-Methyltransferase. Ein solches Enzym wurde am Institut aus Zellkulturen von Berberis wilsoniae isoliert (WAT et al. 1985). Es katalysiert die N-Methylierung von Norretikulin zum Retikulin. Das Enzym setzt sowohl (S)- als auch (R)-Norretikulin unter Erhalt der Konfiguration um. Für die Messung der Enzymaktivität wurde radioaktives (S)-Adenosyl-L-(C^3H_3)-Methionin als Substrat eingesetzt. Die bei der Reaktion auf das entstandene Retikulin mit der Methylgruppe übertragene Radioaktivität wurde, nach selektiver Extraktion des Enzymprodukts mit Isoamylalkohol, zur Quantifizierung des Umsatzes genutzt (siehe II. 2.3.2.).

Das Schlüsselenzym bei der Umwandlung des Benzylisoquinolingrundgerüsts in das der Protoberberinalkaloide ist das Berberin-Brücken-Enzym. Es katalysiert die Bildung der sogenannten Berberin-Brücke und wandelt damit (S)-Retikulin in (S)-Scoulerin um. Ein Testverfahren für dieses Enzym war am Institut von STEFFENS et al. (1984) entwickelt worden. Hierzu war mit Hilfe des zuvor beschriebenen Enzyms ein an der N-Methylgruppe tritiummarkiertes Retikulin synthetisiert worden. Bei Bildung der Berberin-Brücke wird 1/3 des Tritiums ins wäßrige Medium entlassen und dient, nach Entfernung der Restradioaktivität im Produkt und nicht umgesetztem Substrat durch Adsorption an Aktivkohle, als Maß für den Umsatz (siehe Kapitel II. 2.3.3.).

Die Umwandlung von Tetrahydroprotoberberinalkaloiden in Protoberberine wie Berberin oder Jatrorrhizin erfolgt durch das Enzym (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase, das von AMANN (1986) entdeckt und untersucht wurde. Auch hier wurde ein Testverfahren entwickelt, das auf der Basis der Freisetzung von Tritium während der Enzymreaktion arbeitet. Als Substrat wurde (S)- (8,14- 3H_2)-Scoulerin eingesetzt. Die

Messung der Aktivität dieses Enzyms in elicitorversetzten Zellkulturen ist deshalb interessant, weil seine Katalyseprodukte den bisherigen Vorstellungen folgend nicht zu den Vorstufen der Benzophenanthridine gehören sollten.

Ebenfalls am Institut wurde in Zellkulturen von Eschscholtzia ein Enzym gefunden, das die N-Methylierung von Tetrahydroberberin katalysiert (RÜFFER und ZENK 1986). Das hierfür entwickelte Testsystem arbeitete nach dem gleichen Prinzip wie es für die Norretikulin-N-Methyltransferase beschrieben wurde. Das Enzymprodukt N-Methyl-Tetrahydroberberin wurde von TAKAO et al. (1985) als Vorstufe der Benzophenanthridine nachgewiesen.

5.4.2. Entwicklung eines Testverfahrens für eine Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase

Aus den in Kapitel III. 1.5.3. beschriebenen Ergebnissen wird deutlich, daß die Zunahme von oxidierten Benzophenanthridinen nach Zugabe der ethanolgefällten Hefesubstanzen einhergeht mit einer Abnahme (im Falle von Stamm R) oder doch zumindest Konstanz des Gehalts an Dihydrobenzophenanthridinen. Bei allen untersuchten Stämmen von Eschscholtzia californica ist ohne Elicitorbehandlung der Gehalt an Dihydrobenzophenanthridinen höher, als der Gehalt an den entsprechenden oxidierten Verbindungen. Diese Umstände legen den Gedanken nahe, daß die oxidierten Verbindungen aus Dihydrovorstufen entstehen. TAKAO et al. (1983) schließen das aufgrund von Fütterungsexperimenten allerdings aus. Bei Fütterung von 5,6-dihydro(Methyl- $^2\text{H}_3$)Sanguinarin an Kalluskulturen von Maclaya cordata konnten sie keinen Einbau in Chelirubin messen, während die Fütterung von (Methyl- $^2\text{H}_3$)-Sanguinarin sehr wohl zu einem Einbau in Chelirubin

führte.

Die hier vorgestellte Zellkultur und die beobachtete Induktion der Bildung oxidierten Benzophenanthridine bot ein besonders geeignetes System, dieser biosynthetischen Frage auf enzymatischem Niveau nachzugehen durch Entwicklung eines einfachen Enzymtestverfahrens. Gleichzeitig bot ein solches Enzymtestverfahren für eine enzymatische Oxidation von Dihydrobenzophenanthridinalkaloiden auch Gelegenheit, die Untersuchung zur Induktion von Enzymaktivitäten durch Zugabe von Elicitoren um eine Enzymreaktion zu ergänzen, die am Ende eines hypothetischen Biosyntheseweges zu den Benzophenanthridinalkaloiden stehen sollte. Dieser letzte biosynthetische Schritt hätte möglicherweise der limitierende für die ganze Biosynthesekette sein können.

Für ein solches Enzymtestverfahren konnte das am Institut entwickelte Verfahren zum Nachweis der (S)-Tetrahydroprotuberberin-Oxidase als Muster betrachtet werden. Die durch Isolierung aus der Zellkultur gewonnenen, oxidierten Benzophenanthridinalkaloide können leicht mit NaBH_4 reduziert werden. Bei Verwendung von NaB^3H_4 ergibt sich eine Tritiummarkierung in Position 8 der entsprechenden Dihydroverbindung, die bei einer Oxidation der Substanz wieder ins wäßrige Medium entlassen wird (siehe Abbildung 23). Auf diese Weise wurde radioaktiv markiertes Sanguinarin, Chelerythrin, Chelirubin und Macarpin hergestellt (siehe II. 2.2.2.).

Es wurden nun Enzymtestansätze verwendet die 20 μl Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 7.5), 20 μl Dihydromacarpinlösung (1 mM), 20 μl 8- (^3H) -Dihydromacarpin (57 000 dpm) enthielten. Der Testansatz wurde mit Enzymrohextrakt bzw. Wasser auf ein Gesamtvolumen von 250 μl ergänzt. Zur Kontrolle wurde dem Blindwert abgekochter Proteinrohextrakt zugesetzt.

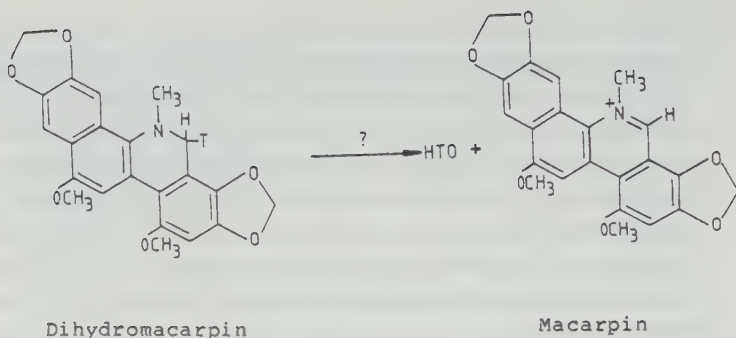


Abb. 23 Prinzip des Tests zum Nachweis einer Dihydrobenzophenanthridin Oxidase Aktivität.
(T = Tritium)

Die verwendeten Proteinrohextrakte wurden durch Standardmethoden aus Gewebe von Stamm W und Stamm TR von Eschscholtzia californica gewonnen. Hierzu wurde durch Vakuumfiltration gewonnenes Gewebe zunächst in flüssigem N₂ schockgefroren. Anschließend wurde es für 30 min in Kaliumphosphatpuffer gerührt (2 ml/g Frischgewicht, 0.1 M, pH 7.5) dem Mercaptoethanol zugesetzt war (20 mM). Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend abzentrifugiert (15 min bei 10000 g) und der klare Überstand in den Enzymtest eingesetzt.

Die Enzymtestansätze wurden anschließend bei 37°C für 40 min inkubiert. Jetzt wurde ihnen, um die Reaktion zu stoppen und nicht umgesetztes Substrat aus dem wäßrigen Milieu zu entfernen, 300 µl einer Aktivkohlesuspension (4 g Aktivkohle + 400 mg Dextran in 100 ml Wasser) zugesetzt. Nach 1 min kräftigen Schüttelns wurde die Aktivkohle durch 5 minütige Zentrifugation in einer Eppendorf Tischzentrifuge von der wäßrigen Lösung getrennt. Aus der im Überstand gemessenen Radioaktivität wurde der Umsatz berechnet. Es gelang mit dieser Methode auf Anhieb in beiden unter-

tersuchten Stämmen nur in den Enzymsätzen mit nicht denaturiertem Protein, eine höhere Tritium-Ausbaurrate zu messen. Es zeigte sich ebenfalls eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge (siehe Kapitel III. 6.1.1.). Zunächst den Enzymsätzen noch zugesetzte, oxidierte Cosubstrate wie NAD und NADP erwiesen sich als überflüssig. Das Testverfahren wurde so wie beschrieben vorläufig für die Untersuchung der Induktion von Enzymaktivitäten in den Zellkulturen durch Elicitorzusatz verwendet.

5.4.3. Enzyminduktionen in verschiedenen Stadien der Wuchskurve einer Kultur von Stamm W

Zunächst wurde untersucht, ob in verschiedenen Stadien der Wuchskurve einer Kultur von Stamm W nach Behandlung mit ethanolgefälltem Hefeelictor eine höhere Aktivität der angesprochenen Enzyme gemessen werden kann, als in Kulturen, die nicht mit Elicitor behandelt worden waren. Hierzu wurden 300 ml Erlenmeyerkolben (75 ml LS-Medium) mit einem Inoculum von 6 g frischen Zellen von Stamm W angeimpft. Die Kolben wurden unter den beschriebenen Bedingungen angezogen. Zu bestimmten Zeiten wurde den Kolben Elicitor in einer Endkonzentration von 250 mg/l zugesetzt. Zur Ermittlung des Benzophenanthridingehaltes wurde ein Teil der Kolben 48 h nach Elicitorzugabe durch Vakuumfiltration geerntet und mit EtOH/HCl wie beschrieben extrahiert. Der Alkaloidgehalt der Extrakte wurde optisch bestimmt. Für die Messung einer möglichen Enzyminduktion wurden die Kolben 16 h nach Elicitorzugabe ebenfalls durch Vakuumfiltration geerntet. 5 g frisches Gewebe der elicitorbehandelten Kulturen und solcher, denen kein Elicitor zugesetzt worden war, wurden zur Proteinextraktion mit N₂(l) schockgefroren. Anschließend wurde das Gewebe 30 min lang in

Aufschlußpuffer (Kaliumphosphat 1 M, pH 7.5, 20 mM Mercaptoethanol) gerührt. Darauf wurden die unlöslichen Bestandteile 15 min lang bei 10 000 g und 4 ° C abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in die jeweiligen Enzymtestverfahren eingesetzt. Als Kontrolle wurden abgekochte Proteinextrakte eingesetzt. In den so beschriebenen Rohextrakten konnten die Enzyme (S)-Norlaudanolin-Synthase und (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase nicht nachgewiesen werden. Die anderen Enzyme konnten sowohl in den elicitorbehandelten Kulturen als auch in den Kontrollen gemessen werden. In allen Fällen konnte in den elicitorbehandelten Kulturen eine höhere Enzymaktivität gemessen werden. Am stärksten war die Induktion der Enzymaktivität wenn der Elicitor in der logarithmischen Wachstumsphase zugegeben wurde. Hierbei war die Reaktion auf Elicitorzusatz aber nicht bei allen Enzymaktivitäten gleich.

Im Falle der Norretikulin-N-Methyltransferase stieg die Enzymaktivität, die pro Liter Medium gemessen werden konnte, in den unbehandelten Kulturen gegen Ende der Wachstumsphase stark an. Wurde der Elicitor in der Zeit vom sechsten bis zum achten Wuchstag zugegeben, kam es nach 16 h zu einer dreifachen Erhöhung der Enzymaktivität. Wird der Elicitor gegen Ende der Wachstumskurve zugegeben, kommt es nur noch zu einer sehr geringen Erhöhung der Enzymaktivität. In der stationären Phase der Wachstumskurve wurde aber auch in unbehandelten Kulturen eine höhere Gesamtaktivität des Enzyms ermittelt, als durch Induktion der Enzymaktivität in der logarithmischen Wachstumsphase erreichbar war.

Auch im Falle des Berberin-Brücken-Enzyms ergab sich in unbehandelten Kulturen eine starke Zunahme der Enzymaktivität in der stationären Wachstumsphase der Kultur. Eine Elicitorzugabe 6 Tage nach Animpfen der Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase führte 16 h

später zu einer mindestens zehnfachen Erhöhung der Enzymaktivität gegenüber nicht mit Elicitor versetzten Kulturen. In diesem Fall übersteigt die nach Elicitorbehandlung gemessene Gesamtaktivität pro Liter Medium auch die in der stationären Phase gemessene Aktivität.

Die Aktivität der gemessenen Tetrahydroberberin-N-Methyltransferase stieg am Ende der Kulturwuchskurve nicht an. Kulturen, denen in der logarithmischen Wuchsphase Elicitor zugesetzt worden war (nach 6 Wuchstagen), zeigten 16 h später eine etwa 4 fach höhere Gesamtaktivität pro Liter Medium. Zugabe des Elicitors in der stationären Wuchsphase führt auch hier nicht mehr zu einer Enzyminduktion.

Die Aktivität des letzten gemessenen Enzyms zeigt ein ähnliches Verhalten wie die Norretikulin-N-Methyltransferase. Auch hier steigt die Gesamtenzymaktivität gegen Ende der Wuchsphase an. In dieser Wuchsphase führt auch die Elicitorzugabe nicht mehr zu einer nennenswerten Induktion der Enzymaktivität. Auch hier jedoch bewirkt eine Elicitorzugabe in der logarithmischen Wuchsphase der Kultur eine Erhöhung der Enzymaktivität nach 16 Stunden. Wird der Elicitor am sechsten Wuchstag zugegeben, ist die Induktion der Enzymaktivität am stärksten (etwa 3 fach). Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

5.4.4. Induktion von Enzymaktivitäten unmittelbar nach Elicitorzugabe zu einer Kultur von Stamm W der Art Eschscholtzia californica

Für diesen Versuch wurde zunächst eine Kultur in gleicher Weise wie im vorherigen Kapitel beschrieben angezogen. Aus den bisherigen Ergebnissen war bekannt, daß bei Zugabe des Elicitors in der logarithmischen Wuchsphase der Kultur die gemessene In

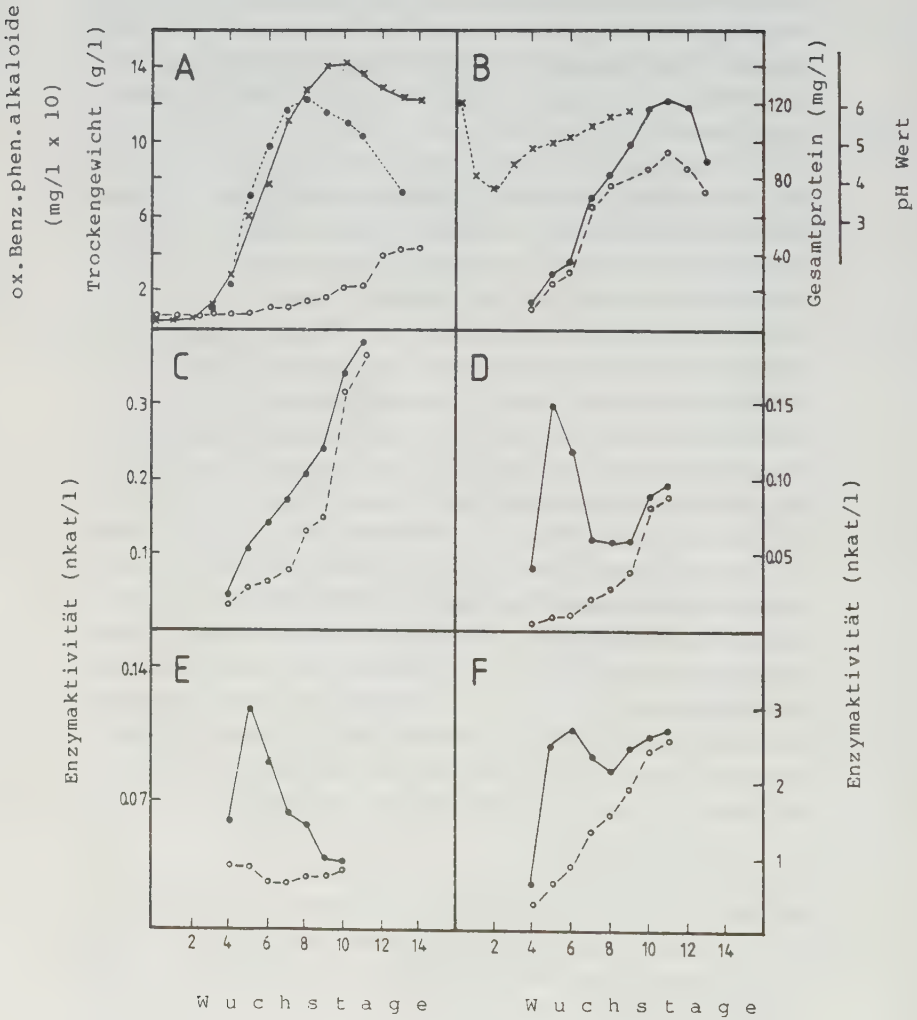


Abb. 24 Induktion von Enzymaktivitäten in verschiedenen Stadien der Wuchskurve einer Kultur von Eschscholtzia californica

Abb. 24 Wuchskurve von Stamm W einer Zellkultur von Eschscholtzia californica. Gemessen wurde die Aktivität von Enzymen aus dem Biosyntheseweg der Benzylisoquinolinalkaloide ohne und nach Zugabe von Hefezellwandbestandteilen. A: Wuchskurve der Kultur (X) Trockengewicht nach verschiedenen Wuchstagen, (O) Gehalt an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden bei Kulturen ohne Elicitorzusatz, (●) und Kulturen denen 48 h zuvor Hefeelictor zugesetzt war. B: pH Wertes des Kulturmediums (X) und des Gesamtproteins der Kultur ohne (O) und 16 h nach Elicitorzusatz (●). Im Rohextrakt wurden die Aktivitäten folgender Enzyme gemessen: C: Gehalt an S-Adenosylmethionin:(R,S)-Norretikulin-N-Methyltransferase; D: Gehalt an Berberin-Brücken-Enzym; E: S-Adenosylmethionin:Canadin-N-Methyltransferase; F: Dihydromacarpin Oxidase. Ermittelt wurde der Gehalt an Enzymaktivität bei Kulturen ohne Elicitorzusatz (O) und Kulturen denen 16 h zuvor 250 mg/l ethanolgefällter Hefeelictor zugegeben worden war (●). Die Enzymtests wurden nach der in Kapitel II. 2.3. beschriebenen Methoden durchgeführt.

duktion von Enzymaktivitäten am stärksten ist. Es erfolgte deshalb die Zugabe von ethanolgefälltem Hefeelictor zu einem Teil der Kulturen am sechsten Wuchstag. Die Endkonzentration des zugesetzten Elicitors betrug auch in diesem Fall 250 mg/l. Neben einer Kontrollprobe unmittelbar nach Elicitorzugabe wurden nun in bestimmten Zeitabständen nach Elicitorzugabe Kulturen durch Vakuumfiltration geerntet. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Kulturen in gleicher Weise geerntet. Ein Teil des vom Medium getrennten Gewebes wurde zur Ermittlung des Alkaloidgehaltes mit EtOH/HCl extrahiert. Der Gesamtgehalt an oxidierten Benzophenanthridinen wurde optisch bestimmt; das Produktspektrum wurde durch HPLC-Analyse ermittelt. Es zeigte sich, daß eine nennenswerte Alkaloidproduktion 20 Stunden nach Elicitorzugabe einsetzt. Interessant ist, daß zunächst das Alkaloid Chelirubin produziert wird. Erst später (nach 30 h) beginnt auch eine

Zunahme des Gehaltes an Macarpin. Etwa zur gleichen Zeit kommt es auch zu einer Steigerung des Gehaltes an Sanguinarin und Chelerythrin. In der Zeit von der vierzigsten bis zur sechzigsten Stunde wird der Anstieg des Chelirubingehaltes langsamer, während der Anstieg des Macarpingehaltes sich weiter beschleunigt. Der Sanguinaringehalt bleibt in dieser Zeit konstant und der Gehalt an Chelerythrin fällt in dieser Zeit wieder etwas zurück (siehe Abbildung 25).

Weitere 5 g des frischen Gewebes wurden zur Enzymextraktion verwendet. Sie erfolgte ebenfalls wie im vorherigen Kapitel beschrieben. Die Proteinextrakte wurden wie beschrieben zur Messung der Enzymaktivitäten herangezogen. Auch bei diesem Experiment konnte in keinem der getesteten Rohextrakte (S)-Norlaudanosolin-Synthase- oder (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase Aktivität gemessen werden.

Im Falle der Norretikulin-N-Methyltransferase konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Gesamtaktivität nach Elicitorzugabe gemessen werden. Zwar stieg die Enzymaktivität auch in den unbehandelten Kulturen an, dieser Anstieg war aber wesentlich langsamer. Nach 60 Stunden wurde in den elicitorversetzten Kulturen eine dreifach höhere Enzymaktivität gemessen als in Kontrollkulturen.

Die Induktion der Berberin-Brücken-Enzym-Aktivität in den elicitorbehandelten Kulturen begann bereits nach 8 h und durchlief nach 16 h ein Maximum. Nach 48 h war die Enzymaktivität in den elicitorbehandelten Kulturen kaum höher als in den unbehandelten. Im Falle dieses Enzyms wurde zum einen die schnellste Reaktion auf Elicitorzusatz beobachtet, zum anderen konnten hier auch die größten Steigerungen der Enzymaktivität gemessen werden. In diesem Versuch wurde nach 16 h sogar eine 14 fach höhere Enzymaktivität gemessen als im Kontrollkulturen.

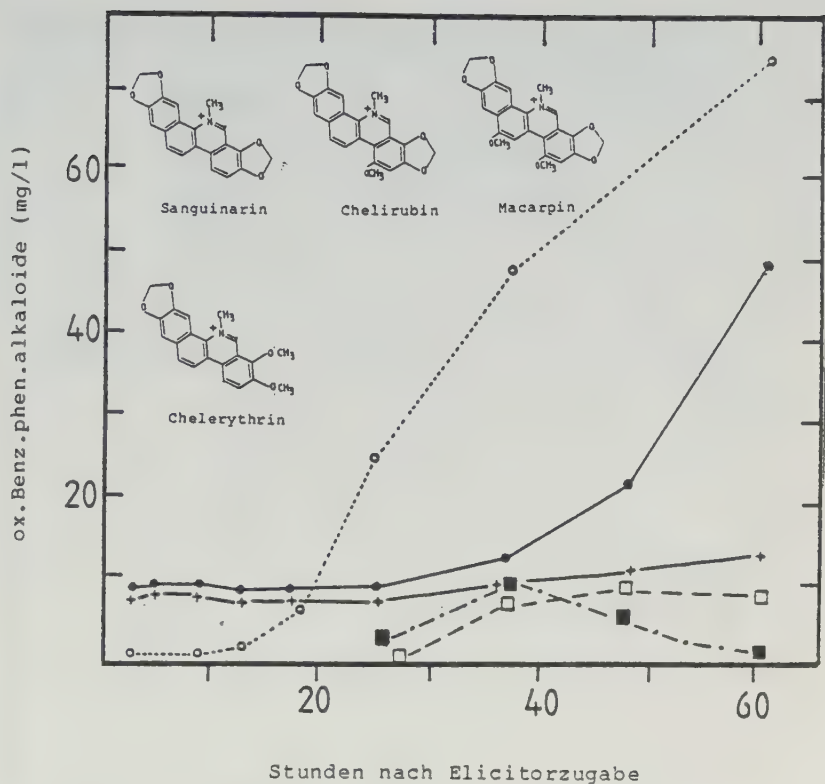


Abb. 25 Veränderung des Gehaltes an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden in 5 Tage alten Kulturen von Stamm W. Zu den angegebenen Zeiten nach Elicitorzusatz wurde die Kultur geerntet und ihr Alkaloidgehalt bestimmt. (X) Alkaloidgehalt der Kontrolle ohne Elicitor (100 % Macarpin). Alkaloidgehalt in elicitorversetzten Kulturen (□) Sanguinarin, (■) Chelerythrin, (○) Chelirubin, (●) Macarpin.

Auch die Zunahme der anderen Enzymaktivitäten zeigte nach Elicitorzugabe einen ähnlichen Verlauf. Im Falle der Canadin-N-Methyltransferase wurde das Maximum der Enzymaktivität 24 h nach Elicitorzugabe gemessen. Es war etwa vierfach höher als in nicht mit

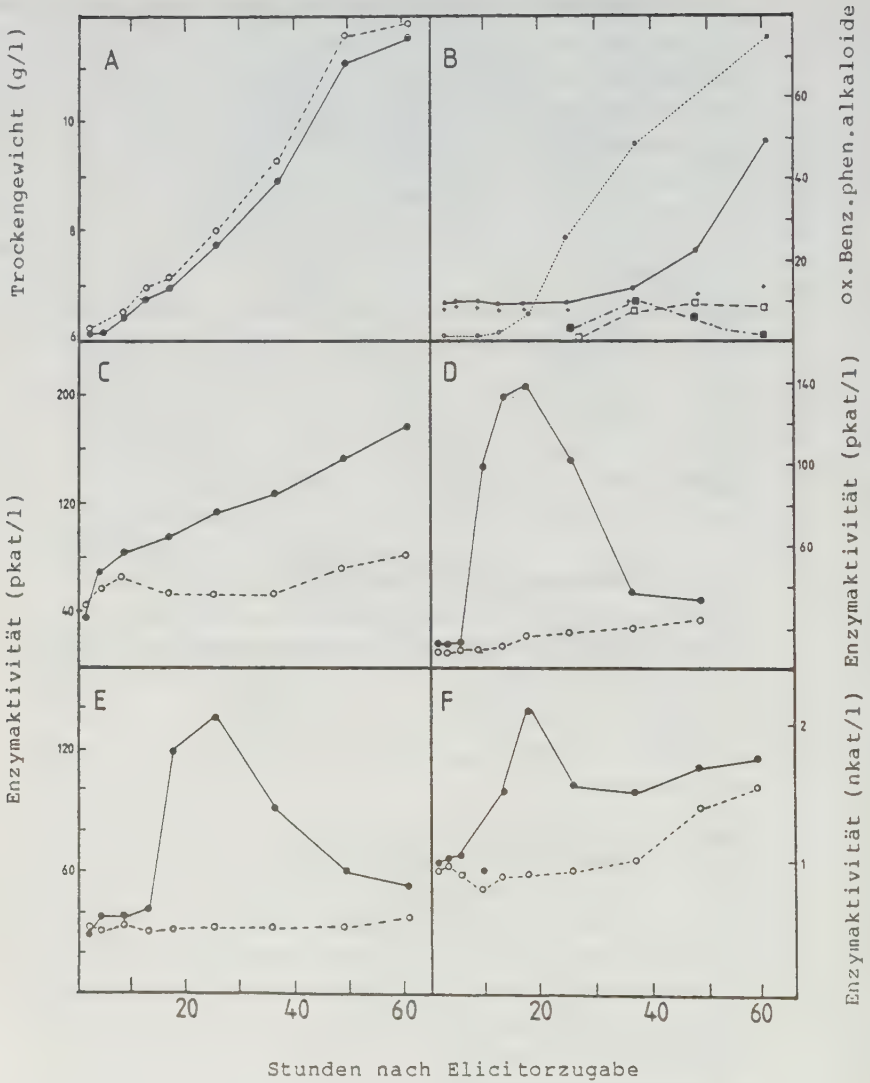


Abb. 25 Induktion von Enzymaktivitäten unmittelbar nach Zugabe von Elicitor zu einer Kultur von Eschscholtzia californica

- Abb. 26 Induktion von Enzymaktivitäten bei Stamm W einer Zellkultur von Eschscholtzia californica nach Zusatz von ethanolgefälltem Hefeellicitor (250 mg/l) zum Kulturmedium. Die Kultur wurde wie bei Abb. 24 beschrieben angezogen. Am fünften Wuchstag wurde den Kulturen der Hefeellicitor in 4 ml LS-Medium autoklaviert zugesetzt. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Kulturen und entsprechende Kontrollen ohne Elicitorzusatz geerntet.
- A: Trockengewicht von Kulturen ohne (○) und mit (●) Elicitorzusatz;
 - B: Gehalt an oxidierten Benzophenanthridinen bei Kulturen ohne (X) und mit Elicitorzusatz, (□) Sanguinarin, (■), Chelerythrin, (○) Chelirubin, (●) Macarpin.
 - C: Gehalt an S-Adenosyl:(R,S)-Norretikulin-N-Methyltransferase;
 - D: Gehalt an Berberin-Brücken-Enzym;
 - E: Gehalt an S-Adenosylmethinin:Tetrahydroberberin-N-Methyltransferase;
 - F: Gehalt an Dihydromacarpin Oxidase.
- (○) Enzymaktivitätsgehalt bei Kulturen ohne, (●) Enzymaktivitätsgehalt bei Kulturen mit Elicitorzusatz. Die Enzymtests wurden wie in Kapitel II. 2.3. beschrieben ausgeführt.

Elicitor behandelten Kulturen. Am schwächsten fiel die Induktion der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase Aktivität aus. Die Enzymaktivität war nach 16 h etwa zweieinhalbfach höher als in unbehandelten Kulturen. Während der 60 h des Beobachtungszeitraumes stieg hier die Enzymaktivität auch in unbehandelten Kulturen am stärksten an. Am Ende des Beobachtungszeitraumes nach 48 bzw. 60 h war infolgedessen wohl auch die Enzymaktivität in den elicitorbehandelten Kulturen wieder höher als nach 36 h. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt.

6. Reinigung und Charakterisierung der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase

6.1. Testsystem und Produktnachweis

Der Nachweis eines Enzyms, das Dihydrobenzophenanthridinalkaloide oxidiert, ist für die Aufklärung der Biosynthese dieser Alkaloidgruppe, wie schon geschildert, von erheblicher Bedeutung. Auch für das Problem der Induktion der Alkaloidbildung bei Eschscholtzia schien eine genauere Untersuchung dieses Enzyms lohnend. Es sollte daher versucht werden, das Enzym zu reinigen und zu charakterisieren. Im vorigen Kapitel wurde bereits das Nachweissystem für die Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase-Aktivität vorgestellt (siehe Abbildung 23). Ähnlich wie bei der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase wird auch hier bei Oxidation des Substrates maximal die Hälfte der eingesetzten Radioaktivität ausgebaut. Dies wurde durch Oxidation des Substrats durch KMnO_4 und CrO_3 bestätigt.

Mit dem Testsystem konnte jetzt festgestellt werden, daß die beobachtete höhere Ausbaurate bei Zusatz von Proteinrohextrakten von Eschscholtzia californica (Stamm W und Stamm TR) von der Menge an zugesetztem Protein abhängig ist. Es zeigte sich auch eine für chemische Reaktionen typische Zeitabhängigkeit der Reaktion (siehe Abbildung 27).

Um vom Nachweis einer echten Enzymreaktion sprechen zu können, war noch der Nachweis des entstandenen Enzymproduktes wichtig. Ein solcher Nachweis wurde mit Hilfe des bekannten HPLC-Analyseverfahrens für Benzophenanthridinalkaloide geführt. Hierzu wurden 4 fache Enzymtestansätze verwendet. Sie enthielten also 0.8 μmol Substrat (80 μl), 800 μmol Kaliumphosphatpuffer (80 μl), 200 μl Proteinrohextrakt.

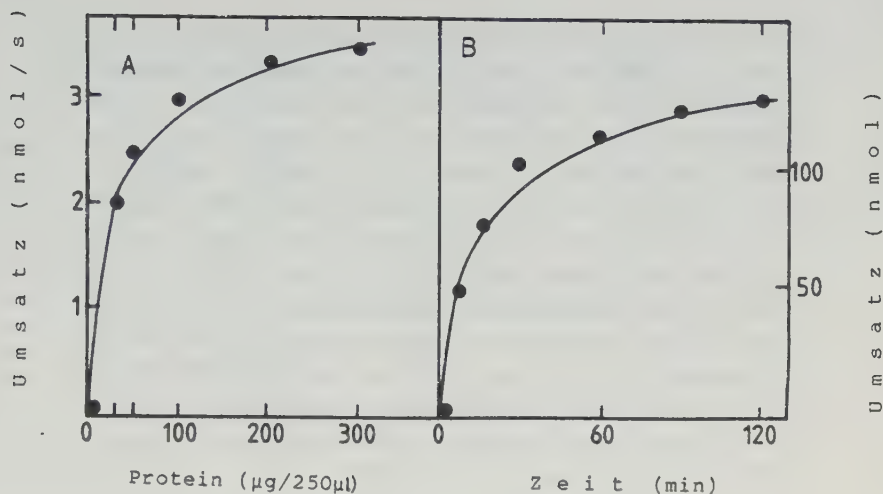


Abb. 27 Proteinabhängigkeit (A) und Zeitabhängigkeit (B) der Enzymreaktion. Für die Messung der Proteinabhängigkeit (A) wurden Standardenzymansätze mit unterschiedlichen Proteinmengen versetzt. Kontrollansätzen wurde die gleiche Menge hitzedenaturiertes Protein zugesetzt. Der mit denaturiertem Protein gemessene Umsatz wurde vom mit Enzym gemessenen Umsatz abgezogen. Die Reaktionszeit war 40 min, die Reaktionstemperatur 30 °C. Für die Messung der Zeitabhängigkeit (B) wurden 10 fache Enzymansätze verwendet. Zugegeben wurden 100 µl Enzymlösung (1.5 mg/l Protein). Zu den angegebenen Zeiten wurde den Ansätzen 250 µl für die Radioaktivitätsmessung entnommen. Zur Kontrolle wurde wieder ein Ansatz mit hitzedenaturiertem Protein benutzt.

(Zugesetzt wurde a. unbehandelter und b. abgekochter Rohextrakt). Der Proteinextrakt enthielt 1.3 mg Protein/ml. Der Testansatz wurde mit 640 µl Wasser zu einem Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Das für diesen Test eingesetzte Substrat bestand in einer 10 millimolaren Dihydromacarpinlösung. Wegen seines stark hydrophoben Charakters war das Dihydromacarpin in einer so hohen Konzentration nicht vollständig löslich. Die hohe Konzentration wurde aber gewählt, um einen deutlichen Nachweis des entstandenen Pro-

dukts mit der HPLC Methode zu gewährleisten. Hierbei war vor allem der qualitative Nachweis des Enzymprodukts wichtig und keine quantitative Bestimmung des Umsatzes. Eine HPLC-Analyse unmittelbar nach Zugabe des Proteinextraktes ergab bei UV-Detektion bei 280 nm nur einen Peak mit der Retentionszeit des Dihydro-macarpin (42.8 min). Hierzu wurde eine Menge von 100 µl des Enzymtestansatzes injiziert. Anschließend wurden die Ansätze für 12 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die jetzt erneut vorgenommene HPLC-Analyse der Testansätze zeigte deutlich das zusätzliche Auftreten eines Peaks mit der Retentionszeit des Macarpin in dem Ansatz, dem nativer Proteinextrakt zugesetzt worden war (siehe Abbildung 28).

6.2. Enzymreinigung

6.2.1. Gewebeaufschluß zur Enzymextraktion

Zum Aufschluß der Zellen wurden diese durch schockgefrieren mit N₂(l) zerstört. Danach wurde das Gewebe mit Kaliumphosphatpuffer (1 ml/g, 0.1 M, pH 7.5, 20 mM Mercaptoethanol) 30 Minuten lang gerührt. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile zunächst durch Abpressen durch 4 Lagen Mull und dann durch 15 minütige Zentrifugation bei 10 000 g entfernt. Der so gewonnene Proteinrohextrakt enthielt im allgemeinen einen Proteinanteil von 1 - 1.8 mg/ml, die Enzymaktivität im Rohextrakt schwankte bei verschiedenen Chargen des Gewebes von Stamm W von 10 - 50 pkat/mg. Neben dem hier angegebenen Puffer wurden auch andere Aufschlußpuffer verwendet. Insbesondere wurde versucht, das Enzym bei verschiedenen pH Werten zu ex-

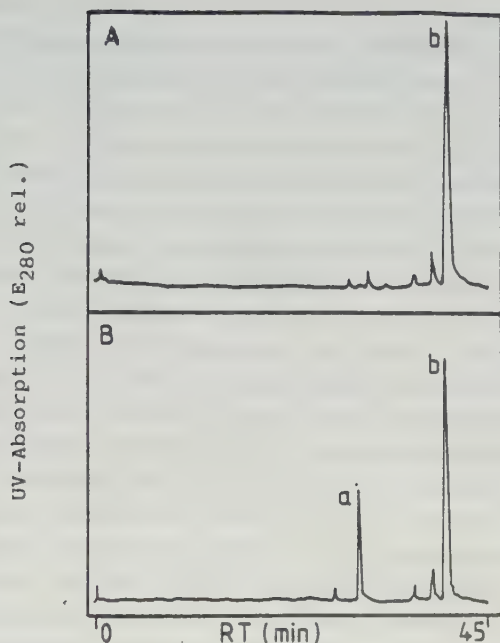


Abb. 28 Produktnachweis der Enzymreaktion. Eingesetzt wurde als Substrat Dihydromacarpin (80 nmol in 80 μ l Wasser gelöst). Der Testansatz enthielt darüberhinaus 80 μ l Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 7.5), 440 μ l Wasser und 400 μ l native oder hitzedenaturierte Proteinlösung. Die Reaktionsdauer betrug 12 Stunden; die Reaktionstemperatur betrug 30 °C. 28 A zeigt die HPLC-Analyse des Reaktionsansatzes dem hitzedenaturierten Protein zugesetzt war. 28 B zeigt die HPLC-Analyse des Testansatzes dem unbehandelten Proteinlösung zugesetzt war. (a) = Macarpin, (b) = Dihydromacarpin.

trahieren. Hierzu wurden Enzymextraktionen mit Tris/HCl Puffer (0.1 M, 20 mM Mercaptoethanol) einmal bei pH 6.5, ein weiteres Mal bei pH 8.4 durchgeführt. Es wurde beim sauren Aufschluß eine höhere spezifische Enzymaktivität isoliert (17.4 pkat/mg) als bei dem basischen (15.2 pkat/mg). Die isolierte

Gesamtaktivität war allerdings bei beiden Aufschlußmethoden nahezu dieselbe (saurer Aufschluß: 5.03 nkat/kg Gewebe; basischer Aufschluß: 4.93 nkat/kg Gewebe).

In gleicher Weise wie beschrieben, wurde eine Enzymextraktion mit Kaliumphosphatpuffer auch mit Gewebe von Stamm TR durchgeführt. Das Enzym konnte in diesen Proteinextrakten ebenfalls nachgewiesen werden. Die spezifische Aktivität lag mit 53 pkat/mg nur unwesentlich höher als eine parallel aus Zellen von Stamm W isolierte (44 pkat/mg).

Um sicherzustellen, daß es sich nicht um eine unspezifische Oxidase-Aktivität handelte, wurde der Versuch mit einem aus der Pflanze Rauvolfia serpentina gewonnenen Proteinrohextrakt wiederholt. Die Pflanze wurde gewählt, weil sie Indol- aber keine Isochinolinalkaloide enthält. Mit den aus dieser Pflanze gewonnenen Rohextrakten konnte bei Einatz von radioaktivem Substrat im Standardtestsystem nach 6 Stunden Inkubation überhaupt kein Umsatz gemessen werden.

6.2.2. Ammoniumsulfatfällung

Da bei vielen Proteinreinigungsmethoden eine Verdünnung von Protein und Enzym eintritt, ist es vorteilhaft, an den Anfang eines Reinigungssystems eine Methode zu stellen, bei der die Enzymlösung gleichzeitig konzentriert wird. Eine solche ist die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung. Zur Konzentrierung des Enzyms und zur ersten Reinigung wurde mit dem wie beschrieben gewonnenen Proteinrohextrakt eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Hierzu wurde zu 1.8 l Rohextrakt mit einem Gesamtproteingehalt von 2223 mg und einer Gesamtenzymaktivität von 25.2 nkat stufenweise Ammoniumsulfat zugegeben. Nach Erreichen einer

gewünschten Fällungsstufe (hier wurden 10 % Schritte gewählt) wurde der Rohextrakt für 30 Minuten gerührt, um eine vollständige Fällung zu garantieren. Danach wurde das ausgefallene Protein durch 20 minütige Zentrifugation bei 10 000 g aus dem Extrakt entfernt. Das Proteinpellet wurde in 20 ml Puffer resuspendiert und der Proteingehalt und die Enzymaktivität bestimmt. Zum Überstand der Zentrifugation wurde weiteres Ammoniumsulfat zugegeben, bis zum Erreichen der nächsten Fällungsstufe.

Nach dieser Methode wurden in den Fällungsschritten von 50 - 75 % Ammoniumsulfatsättigung 92 % der insgesamt wiedergefundenen Enzymaktivität bestimmt. Trotzdem lieferte die Methode nur eine mäßige Anreicherung des Enzyms. Grund hierfür waren wohl hohe Verluste der Gesamtaktivität durch die Ammoniumsulfatfällung. Insgesamt wurden nur 25 % der eingesetzten Gesamtzymaktivität wiedergefunden (Ergebnisse siehe Tabelle 10). Trotzdem wurde die Methode der Ammoniumsulfatfällung wegen ihres Konzentrierungseffektes für die Enzymreinigung beibehalten.

6.2.3. Entsalzen von Proteinlösungen

Nach der Konzentrierung von Proteinlösungen durch Ammoniumsulfatfällungen enthalten die gewonnenen Lösungen zumeist sehr hohe Salzgehalte. Um die Anwendung von Ionenaustauschern für eine weitere Reinigung möglich zu machen, muß der hohe Salzgehalt gesenkt werden. Die einfachsten Methoden für diesen Zweck sind die Dialyse oder die Gelchromatographie. Beide Methoden haben zudem den Vorteil, daß gleichzeitig eine Abtrennung von niedermolekularen Substanzen erfolgt, soweit diese nicht schon durch die Fällung aus dem Proteinrohextrakt entfernt worden sind.

eingesetzt: 25.2 nkat Enzymakt.; 2223 mg Protein		
erhalten: 5.4 nkat Enzymakt.; 468 mg Protein		
% NH ₄ SO ₄ Sättig.	Enzymakt.(pkat)	Protein (mg)
0 - 30	105.8 (1.4 %)	92.1 (8.6 %)
30 - 40	113.5 (1.5 %)	132.0 (12.4 %)
40 - 50	325.0 (4.3 %)	364.0 (34.0 %)
50 - 60	748.3 (9.9 %)	192.4 (18.0 %)
60 - 75	6252.0 (82.7 %)	274.1 (25.6 %)

Tab. 10 Ergebnis der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung des Proteins aus einem Proteinrohextrakt von Stamm W. Angegeben ist der in den einzelnen Fällungsschritten wiedergefundene Proteinanteil und die wiedergefundene Enzymaktivität.

Bei einer Entsalzung der Proteinlösungen durch Dialyse stellten sich relativ hohe Verluste an spezifischer- und Gesamtzymaktivität ein. Bei Dialyse über Nacht von 30 ml einer Proteinlösung nach Ammoniumsulfatfällung (11.03 mg/ml) mit einer spez. Enzymaktivität von 32 pkat/mg gegen 5 l 0.02 M Kaliumphosphatpuffer, hatte die erhaltene Lösung nach Abzentrifugieren des ausgefallenen Proteins, nur noch einen Proteingehalt von 6.1 mg/l und eine spez. Enzymaktivität von 15 pkat/mg. Die Gesamtzymaktivität war damit um 73 % gefallen.

Bei einer Entsalzung durch Gelchromatographie traten dagegen keine Verluste an Protein oder Enzymaktivität auf. Für diese Methode wurde eine Säule mit den Abmessungen 5 x 95 cm (1865 ml Gelbettvolumen) verwendet, die mit dem Säulenmaterial ACA 44 gefüllt war. Equilibriert war die Säule mit 0.02 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7.5, 20 mM Mercaptoethanol). Be-

schickt wurde sie mit 40 ml einer durch Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Proteinlösung. Die Flußrate betrug 1.5 ml/min. Der Säulendurchlauf wurde in 60 Fraktionen zu je 20 ml aufgefangen. Die gesamte Enzymaktivität wurde in den Fraktionen 31 - 47 wiedergefunden. Nach dieser Methode wurde jedoch keine nennenswerte Anreicherung der Enzymaktivität erreicht.

6.2.4. Chromatographie an DEAE-Sepharose

Durch Vorversuche hatte sich gezeigt, daß bei Verwendung des beschriebenen Puffersystems aus 20 millimolarem Kaliumphosphatpuffer bei einem pH Wert von 7.5 das gesuchte Enzym nicht an DEAE-Cellulose adsorbiert wird. Für eine Reinigung wurde nun eine Säule mit den Abmessungen 1.5 x 22 cm (Volumen = 38.9 ml) verwendet die mit DEAE-Sepharose der Firma Amicon gefüllt war. Mit einer Geschwindigkeit von 60 ml/h wurde die Proteinlösung, die wie zuvor beschrieben, durch Gelchromatographie entsalzt worden war, über diese Säule gepumpt. Es erfolgte ein Nachwaschen der Säule mit 50 ml Kaliumphosphatpuffer. Die gesamte aufgegebene Enzymaktivität (5.2 nkat; 11.7 pkat/mg) konnte im Säulendurchlauf wiedergefunden werden. In Bezug auf den unbehandelten Proteinrohextrakt wurde hierbei eine 15 fache Anreicherung erreicht (auf 169 pkat/mg) erreicht.

6.2.5. Chromatographie an CM-Cellulose

Aus den Ergebnissen der Chromatographie an DEAE-Sepharose konnte geschlossen werden, daß das gesuchte Enzym einen relativ basischen isoelektrischen Punkt haben sollte. Es wurde daher auch eine Chromatographie an CM-Cellulose versucht. Gearbeitet wurde mit

dem gleichen Puffersystem wie bei der Chromatographie an DEAE-Sepharose. Die verwendete Säule hatte ein Volumen von 20 ml (1.5 x 11 cm). Sie war gefüllt mit CM-Cellulose der Firma Whatman. Die Aufgabe- und Elutionsgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. In einem Vorversuch wurde die Säule nach Aufgabe des Proteins stufenweise mit steigenden Salzkonzentrationen im Puffer eluiert. Es wurden vier Stufen mit 0.5 %, 1 %, 1.5 % und 2 % KCl Gehalt verwendet. Die gesamte wiedergefundene Aktivität (etwa 50 % der aufgegebenen Enzymaktivität) wurde in den Elutionsstufen bis 1 % KCl wiedergefunden. Im endgültigen Reinigungsschema wurde der Durchlauf der DEAE-Sepharosesäule direkt auf die beschriebene CM-Cellulose Säule aufgegeben. Von der dabei aufgegebenen Gesamtenzymaktivität (5.2 nkat) wurden 60 % (3.1 nkat) vom aufgegebenen Protein (31 mg) 43 % bei einer Elution der Säule wiedergefunden. Eluiert wurde nach Aufgabe des Proteins mit 40 ml eines Elutionspuffers, dem in 1 M Konzentration KCl zugesetzt war. Gegenüber der Enzymaktivität im Durchlauf der DEAE-Sepharose Säule ergab sich hierdurch eine weitere Anreicherung der spezifischen Enzymaktivität um den Faktor 1.5 (230 pkat/mg).

6.2.6. Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) an dem Säulenmaterial Mono-Q

Bei dem hier verwendeten Säulenmaterial handelt es sich ebenfalls um einen Ionenaustauscher, der als bindende Komponente Diethylaminoethyl-Gruppen hat. Trägermaterial ist aber nicht mehr Sepharose sondern ein Kunststoff, der die Herstellung von Partikeln mit idealer Kugelform gestattet. Hierdurch wird eine besonders gute Säulenpackung erreicht. Die Bindungskapazität ist nach Angaben des Herstellers (Pharmacia) größer als die von DEAE-Sepharose. Es wurde

versucht, durch Verwendung eines anderen Puffersystems und eines stärker basischen pH Wertes, eine Bindung des Enzyms an dieses Säulenmaterial zu erreichen. Der Wechsel des Puffers schien hierbei auch deshalb nötig, weil ebenfalls nach Angaben des Herstellers Phosphatpuffer die Bindungskapazität des Säulenmaterials für Proteine herabsetzt. Es wurde für diesen Reinigungsschritt daher Tris/HCl Puffer (20 mM, pH 8.9) verwendet. Mit dem beschriebenen Puffersystem konnte ein so stark basischer pH-Wert nur durch Weglassen von Mercaptoethanol im PCuffersystem erreicht werden. Vor Aufgabe des Proteins wurde das bei Chromatographie an CM-Cellulose erhaltene Säuleneluat gegen 3 l des beschriebenen basischeren Puffersystem über Nacht bei 4 °C dialysiert. Hierbei traten nicht wie bei der Dialyse des Rohextraktes Verluste der Enzymaktivität auf. Die Aufgabe und die Elution des Proteins mit einem KCl Gradienten erfolgte mit einem programmierbaren FPLC-System der Firma Pharmacia.

Die verwendete Säule hatte ein Volumen von 1 ml; die verwendete Aufgabe- und Elutionsgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Zunächst erfolgte 42 Minuten lang die Aufgabe der Proteinelösung. Weitere 10 Minuten lang wurde die Säule mit dem Aufgabepuffer gewaschen. Danach wurde mit einem linearen Gradienten von 0 - 0.5 M KCl im Elutionspuffer für 50 Minuten eluiert. Ein automatisches Nachwaschen der Säule mit Elutionspuffer, der 1 M KCl enthielt, für 10 Minuten schloß sich an. Das Enzym wurde bei einer Salzkonzentration von 0.2 M KCl eluiert. Wenn das gesamte Volumen der nach Chromatographie an CM-Cellulose erhaltenen Proteinelösung aufgegeben wurde, fanden sich ungefähr 40 % der Enzymaktivität noch im Säulendurchlauf. Dies kann auf eine Überladung der Säule zurückgeführt werden, da nach erneuter Aufgabe des Säulendurchlaufs und Elution nach derselben Methode die restliche

Enzymaktivität auch gebunden und eluiert werden konnte. Bei Verwendung des Eluats der CM-Cellulose Chromatographie für die FPLC-Methode ergab sich bei einer Enzymausbeute von 24 % und Anreicherungsfaktor von 4 für die spezifische Enzymaktivität (813.6 pkat/mg). Abbildung 29 zeigt das Elutionsprofil der Mono-Q Säule.

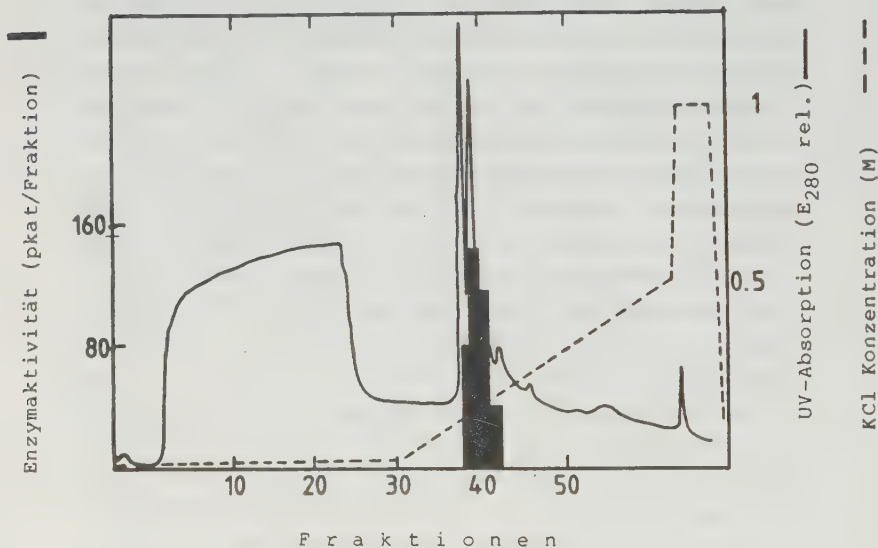


Abb. 29 Elutionsprofil der Mono-Q Säule. Aufgegeben wurden 40 ml einer Proteinlösung, die 13 mg Protein und eine Enzymaktivität von 3.0 nkat (230 pkat/mg) enthielt. Die Proteinlösung war durch frakt. Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie an DEAE-Sephrose und CM-Cellulose vorgereinigt. Puffersystem: Tris/HCl 0.02 mM, pH 8.9; Elutionsgeschwindigkeit: 1 ml/min. Durchlauf und Eluat wurden in Fraktionen zu 1.5 ml aufgefangen. Als Substrat für den Standard-enzymtest diente Dihydromacarpin.

6.2.7. Reinigungsschema für die Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase-Aktivität

Die sukzessive Anwendung der beschriebenen Verfahren führte zu einem Reinigungsschema für die beschriebene Enzymaktivität, das eine 70 fache Anreicherung des Enzyms aus dem Rohextrakt gestattete. Der Nachteil des Reinigungsschemas liegt in der sehr geringen Ausbeute an Enzymaktivität. Sie beträgt insgesamt nur 3 %. Die größten Verluste treten bei der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung auf. Das System gestattet jedoch eine relativ schnelle Reinigung des Enzyms. Für den Ablauf des gesamten Schemas werden nur etwa drei Tage bei relativ geringem Arbeitsaufwand gebraucht. Maßgeblich für die Konzeption eines schnellen Reinigungsschemas war die relativ geringe Stabilität der Enzymaktivität im Proteinrohextrakt. Hier konnte schon nach 2 Tagen keine Enzymaktivität mehr gemessen werden. Nach Reinigung durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie an DEAE-Sepharose und CM-Cellulose betrug die Halbwertszeit des Enzyms jedoch eine Woche.

Versuche zur Reinigung der Enzymaktivität durch Acrylamidgelelektrophorese scheiterten. Trotz Anwendung verschiedener Systeme konnte in keinem Fall aktives Enzym aus dem Trenngel eluiert werden.

Tabelle 11 faßt das Ergebnis des Reinigungsschemas zusammen.

Methode	Gesamtprotein (mg)	Enzymaktivität (pkat)	spez. Enzymakt. (pkat/mg)	Anreicherung	Ausbeute (%)
Roheextrakt	2223	25153	11.3	0	100
frakt. NH_4SO_4 Fällung	467	5304	11.5	1.02	21
Entsalzen durch Gelchromatogr.	460	5215	11.7	1.04	20
Chromatographie an DEAE-Sephar.	31	5100	169.0	14.91	19
Chromatographie an CM-Cellulose	14	3096	230.0	20.04	12
FPLC an Mono-Q Material	0.9	754	813.0	72.00	3

Tab. 11 Anreicherungsstabelle für die Reinigung einer Dihydrobenzophenanthridin
Oxidase Aktivität aus Zellen von Stamm W einer Zellkultur der Pflanze
Eschscholtzia californica.

6.3. Charakterisierung der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase

6.3.1. Protein- und Zeitabhängigkeit der Enzymreaktion

Das wie zuvor beschrieben 70 fach angereicherte Enzym sollte nun charakterisiert werden. Hierzu wurden zunächst noch einmal die Meßparameter für die folgenden Tests festgelegt. Dies geschah durch Messung der Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion von der zugesetzten Proteinmenge. Hierzu wurden die Enzymtestansätze für 40 Minuten bei 37 °C mit den angegebenen Proteinmengen inkubiert. Als Blindwert dienten wieder Testansätze, denen hitzedenaturiertes Protein zugesetzt war.

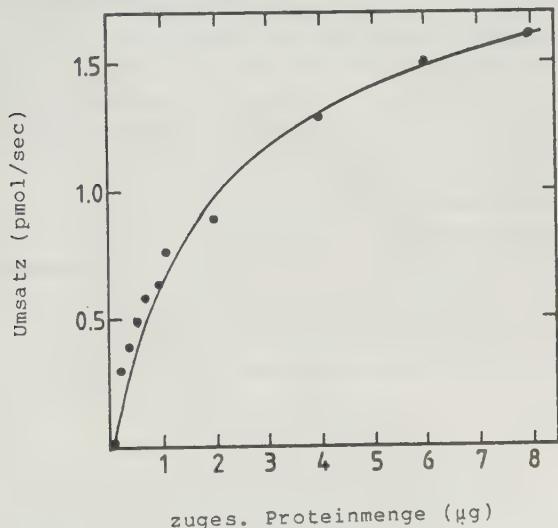


Abb. 30 Proteinabhängigkeit der Enzymreaktion gemessen im Standardtestansatz. Reaktionszeit = 40 min; Reaktionstemperatur = 37 °C.

Mit einem Zusatz von 1 μg Protein wurde nun noch einmal der kinetische Verlauf der enzymatischen Reaktion verfolgt. Wieder wurden den Blindwerten hitzedenaturierte Proteinlösungen zugesetzt. Verwendet wurden hierzu 15 fache Standardenzymansätze, denen zu bestimmten Zeiten ein Aliquot von 250 μl zur Messung des Umsatzes entnommen wurde. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C. Aufgrund der Ergebnisse wurde für künftige Tests eine Reaktionszeit von 40 Minuten gewählt. Auch bei dem 70 fach angereicherten Enzym wurden die beschriebenen Kurven ohne Zusatz irgendeines Cosubstrats erzielt. Angesichts dieses Umstandes kommt vor allem noch Sauerstoff als Cosubstrat der Reaktion in Betracht und die Bezeichnung Oxidase für dieses Enzym scheint daher gerechtfertigt.

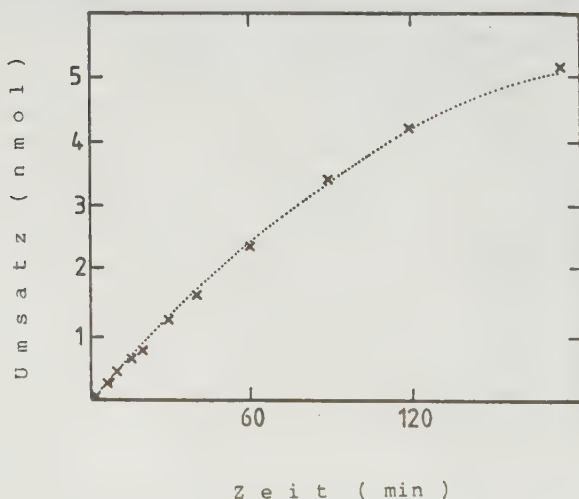


Abb. 31 Zeitabhängigkeit der Enzymreaktion bei Zu-
von 10 μl (1 μg) der 70 fach angereicher-
ten Enzymlösung in den Standardtestansatz.
(Reaktionstemperatur = 37 °C)

6.3.2. Temperaturabhängigkeit der Enzymreaktion

Mit der wie beschrieben gereinigten Enzymlösung wurde die Temperaturabhängigkeit der Enzymreaktion aufgenommen. Infolge der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten einer chemischen Reaktion nimmt auch die Geschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion mit der Temperatur zu. Bei höheren Temperaturen setzt aber zumeist eine thermische Denaturierung des Enzyms ein, die ein weiteres Ansteigen der katalysierten Reaktion verhindert. In diesem Fall wurden Standardenzymansätze, denen $1\text{ }\mu\text{g}$ des 70 fach angereicherten Proteins zugegeben war, bei unterschiedlichen Temperaturen 40 Minuten lang inkubiert. Bis zu einer Temperatur von $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ steigt die Reaktionsgeschwindigkeit an. Bei höheren Temperaturen allerdings fällt die Geschwindigkeit der Reaktion schnell ab. Abbildung 32 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Reaktion. Aufgrund des gemessenen Temperaturprofils wurde für die folgenden Tests die Reaktionstemperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ beibehalten. Eine Auftragung der im Bereich von $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessenen Werte nach Arrhenius gestattet die Abschätzung eines Q_{10} -Wertes von 2.2 und einer Aktivierungsenergie von 53 kJ/mol für das hier verwendete Substrat Dihydromacarpin.

6.3.3. pH-Optimum der Enzymreaktion

Der pH-Wert beeinflusst eine enzymatisch katalysierte Reaktion nicht nur durch seine Wirkung auf das Substrat bzw. auf reaktive Zwischenstufen, sondern auch durch Wirkungen auf Ladungszustand und Struktur des Enzyms. Die pH-Abhängigkeit der Reaktion wurde mit verschiedenen Puffern gemessen. Für die sauren

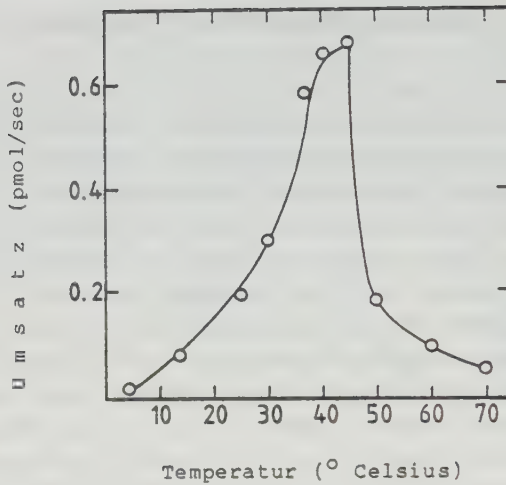


Abb. 32 Temperaturabhängigkeit der Dihydromacarpin Oxidase. Gemessen wurde im Standardtestverfahren. (Reaktionszeit = 40 Minuten)

pH-Werte wurde Natriumcitrat-Puffer verwendet; für die pH-Werte im neutralen Bereich wurde Kaliumphosphatpuffer verwendet; der Umsatz bei basischen pH Werten wurde mit Glycin/NaOH Puffer gemessen. Die für die Messungen in den Standardtestansatz gegebene Proteinmenge betrug 1 µg. Die Inkubationszeit war 40 Minuten, die Reaktionstemperatur 37 °C. Parallel zu den Standardenzymtestansätzen wurden Enzymansätze mit doppeltem Volumen und ohne Zugabe von radioaktivem Substrat inkubiert. Diese Testansätze dienen zur Messung des realen pH-Wertes nach der Reaktion. Dieser wich zumeist leicht von dem des zugesetzten Puffers ab. Das pH-Optimum der Reaktion betrug pH 7.0. Es wurde erreicht bei Zugabe eines Kaliumphosphatpuffers mit pH 7.5 zum Standardtestansatz. In biosynthetischem Zusammenhang ist der deutliche Unterschied zum pH Optimum der anderen untersuchten Enzyme aus dem Biosyntheseweg der Protoberberine, insbesondere

der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase des Berberin-Brücken-Enzyms und der Canadin N-Methyltransferase, bemerkenswert. Das pH Optimum der beiden, in der Zelle kompartimentiert vorliegenden Enzyme beträgt pH 8.9.

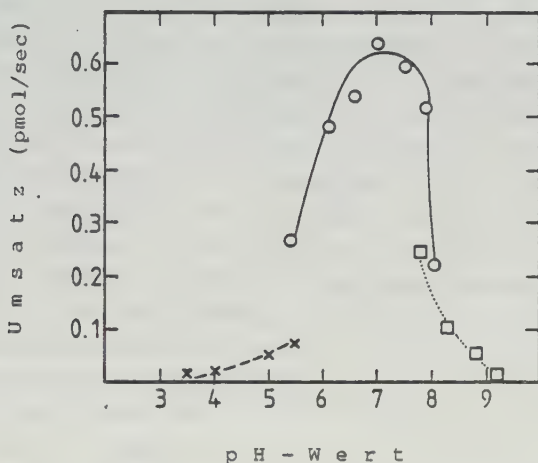


Abb. 33 pH Abhängigkeit der Dihydromacarpin-Oxidase-Reaktion gemessen im Standardtestansatz. Verwendet wurden: (X) Natriumcitrat Puffer, (O) Kaliumphosphat Puffer, (□) Glycin/NaOH-Puffer. (Reaktionszeit = 40 min; Reaktionstemperatur = 37 °C)

6.3.4. Substratspezifität der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase

Für die Ermittlung der Substratspezifität standen neben dem bislang als Substrat verwendeten Dihydromacarpin, auch radioaktiv markiertes Dihydrosanguinarin, Dihydrochelerythrin und Dihydrochelirubin zur Verfügung. Die Substanzen waren in der gleichen Weise

wie das Macarpin in der Position 8 radioaktiv markiert und mit diesem zusammen aus oxidierten Vorstufen durch Reduktion mit NaB^3H_4 synthetisiert worden. Sie konnten, ohne Veränderungen des Standardtestsystems vornehmen zu müssen, als Enzymsubstrate eingesetzt werden. Für diese Substrate wurden nun K_m -Werte bestimmt. Diesmal wurde dem Standardenzymtestansatz $0.21 \mu\text{g}$ (0.15 pkat) der gereinigten Proteinlösung zugesetzt. Die geringere Enzymmenge wurde gewählt, um auch bei kleinen Substratkonzentrationen einen Umsatz im linearen Bereich der Reaktionskinetik zu gewährleisten. Die Reaktionszeit betrug 40 Minuten; die Reaktionstemperatur war 37°C ; der pH Wert war 7.5. Die höchste Affinität zeigte das Enzym hierbei zu dem Substrat Dihydromacarpin. Abbildung 33 zeigt das Ergebnis der Messungen für dieses Substrat. Den höchsten K_m -Wert und damit die geringste Affinität zum Enzym zeigte das Substrat Dihydrosanguinarin. Alle gemessenen K_m -Werte weichen allerdings nicht stark voneinander ab. Soll das Enzym nach dem Substrat mit der höchsten Affinität benannt werden, folgt aus diesen Messungen der Name Dihydromacarpin-Oxidase. Am interessantesten ist aber der Umstand, daß bei Einsatz von Dihydrochelerythrin mit dem beschriebenen Testsystem gar kein Umsatz gemessen werden kann.

Weitere radioaktiv markierte Substrate standen nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der HPLC-Analytik untersucht, ob das Enzym auch in der Lage ist, das Alkaloid Chelidonin zu oxidieren. Hierzu wurden vierfache Standardenzymansätze verwendet. Ihnen war in $35.7 \mu\text{molarer}$ Konzentration Chelidonin zugesetzt. Die Reaktionstemperatur betrug 37°C . Nach 6, 12 und 36 Stunden wurde den Ansätzen $100 \mu\text{l}$ entnommen und mit der HPLC-Methode analysiert. Auch nach 36 Stunden konnte kein Umsatz gemessen werden.

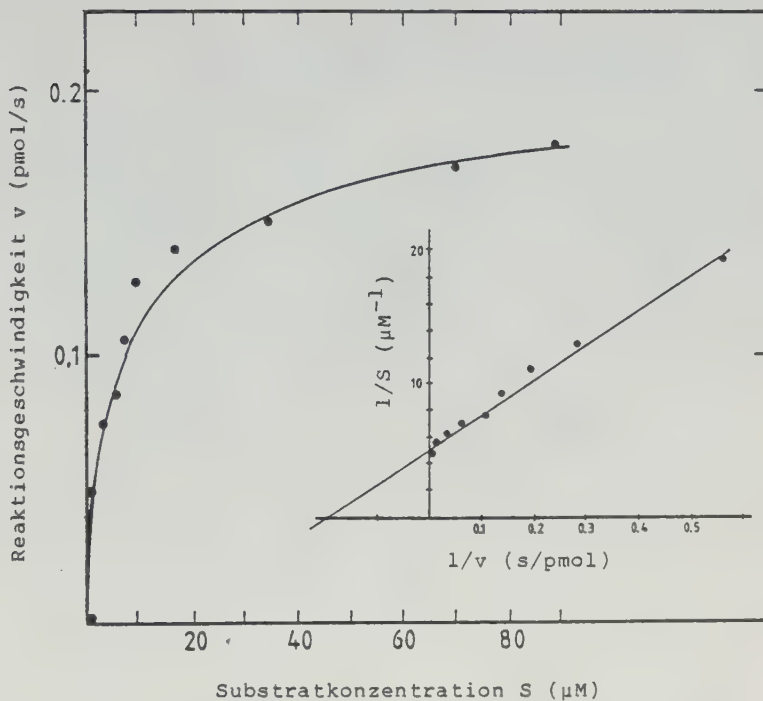
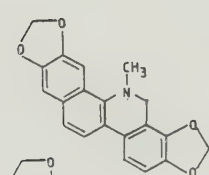


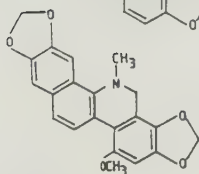
Abb. 34 Bestimmung der MICHAELIS-Konstante für das Substrat Dihydromacarpin im Standardtestverfahren.



Dihydrosanguinarin

$$K_m = 16.0 \mu\text{M}$$

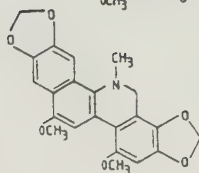
$$v_{\max} = 0.10 \text{ pmol/s}$$



Dihydrochelirubin

$$K_m = 8.0 \mu\text{M}$$

$$v_{\max} = 0.25 \text{ pmol/s}$$



Dihydromacarpin

$$K_m = 5.6 \mu\text{M}$$

$$v_{\max} = 0.20 \text{ pmol/s}$$

6.3.5. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht von Proteinen wird für gewöhnlich über diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese oder durch Gelpermeationschromatographie bestimmt. Da in unserem Fall eine Zuordnung der Enzymaktivität zu bestimmten Proteinbanden eines Polyacrylamidgel nicht möglich war, blieb nur die zweite Methode. Durchgeführt wurde eine Gelpermeationschromatographie mit einer TSK G 3000 SW-Säule. Sie hatte die Abmessungen 21.5 x 60 cm. Die Säule war äquilibriert mit einem 25 millimolaren Kaliumphosphatpuffer (pH 6.0), dem in 25 millimolarer Konzentration NaCl zugesetzt war. Die Säule wurde mit einer Flußrate von 1.5 ml/min bei einer Temperatur von 7 °C betrieben. Dabei entstand auf der Säule ein Druck von 20 bar. In einem Aufgabevolumen von 1 ml wurden mit dieser Säule und unter den beschriebenen Bedingungen 70 pkat des gereinigten Enzyms aufgetrennt. Das Säuleneluat wurde zeitprogrammiert in Fraktionen zu je 1 Minute aufgefangen. Ein Aliquot der Fraktionen (100 µl) wurde anschließend auf Enzymaktivität getestet.

Zur Ermittlung des Molekulargewichts wurde danach unter den gleichen Bedingungen eine Lösung mit Eichproteinen aufgetrennt. Diese Lösung enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml 750 µg Rinderserumalbumin (66 kD), 625 µg Ovalbumin (45 kD), 150 µg Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (36 kD), 200 µg Carboanhydrase (29 kD) und 120 µg Myoglobin (17.8 kD). Das Elutionsvolumen der Proteine wurde durch Detektion der Absorption bei 280 nm ermittelt.

Der Vergleich mit den Elutionsvolumina dieser Eichproteine ergab für die Dihydromacarpin-Oxidase ein Molekulargewicht von ungefähr 56 kD (siehe Abbildung 35).

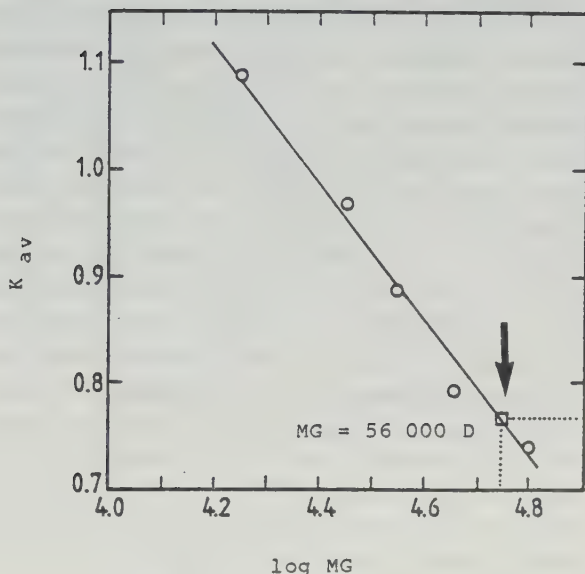


Abb. 35 Ermittlung des Molekulargewichts durch Gel-permeationschromatographie an einer TSK G 3000 Säule. Als Eichproteine wurden verwendet: Rinderserumalbumin (66 kD), Ovalbumin (45 kD), Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (36 kD), Carboanhydrase (29 kD), Myoglobin (17.8 kD).

6.3.6. Ermittlung des isoelektrischen Punktes der Dihydromacarpin-Oxidase

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes eines Proteins kann die Methode der Säulen-Chromatofokussierung angewendet werden. Hierbei wird das zu untersuchende Protein zunächst an einen speziellen Anionenaustauscher gebunden. In unserem Fall wurde das Material PBE 94 der Firma Pharmacia verwendet. Die Elution der Säule mit einem ampholytischen Puffersy-

stem führt zur Entstehung eines pH Gradienten. Die Elution der Proteine erfolgt bei ihren jeweiligen isoelektrischen Punkten. Der hier verwendete Aufgabepuffer enthielt Ethanolamin und Essigsäure in einer 25 millimolaren Konzentration und hatte einen pH-Wert von 9.4. Der Elutionspuffer bestand aus dem ebenfalls bei der Firma Pharmacia käuflichen, ampholytischen Puffersystem Polybuffer 96, das mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 6.0 eingestellt wurde. Ein solches System sollte die Ausbildung eines pH-Gradienten von pH 9 bis pH 6 ermöglichen. Das System wurde gewählt, weil aus den Erfahrungen mit der Ionenaustauscher-Chromatographie ein basischer isoelektrischer Punkt des Enzyms zu erwarten war. Die verwendete Säule hatte einen Durchmesser von 0.56 cm und war 20 cm lang. Das Säulenvolumen war somit 4.9 ml. Auf die Säule aufgegeben wurden 70 pkat Enzymaktivität in einem Gesamtvolumen von 1.5 ml (1.6 mg Protein/ml). Es handelte sich um einen nicht vorgereinigten Proteinextrakt von Stamm W Zellen. Der Rohextrakt wurde vor Aufgabe auf die Säule gegen 4 l des Aufgabepuffers dialysiert. Nach Aufgabe des Enzyms wurde noch mit 5 ml Aufgabepuffer nachgewaschen. Danach erfolgte die Elution mit 120 ml Elutionspuffer. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 10 ml/h. Das Eluat wurde zeitprogrammiert in Fraktionen à 7 ml aufgefangen. Ein Aliquot von 100 µl der einzelnen Fraktionen wurde in den Standardenzymtest eingesetzt. Das Maximum der Enzymaktivität wurde in einer Fraktion mit pH 8.8 gefunden. Für das Enzym kann damit ein isoelektrischer Punkt von pH 8.8 angenommen werden. Das Elutionsprofil der Chromatofokussierungssäule ist in Abbildung 36 dargestellt. Das Ergebnis deckt sich gut mit der Erfahrungen aus der Ionenaustauscher-Chromatographie.

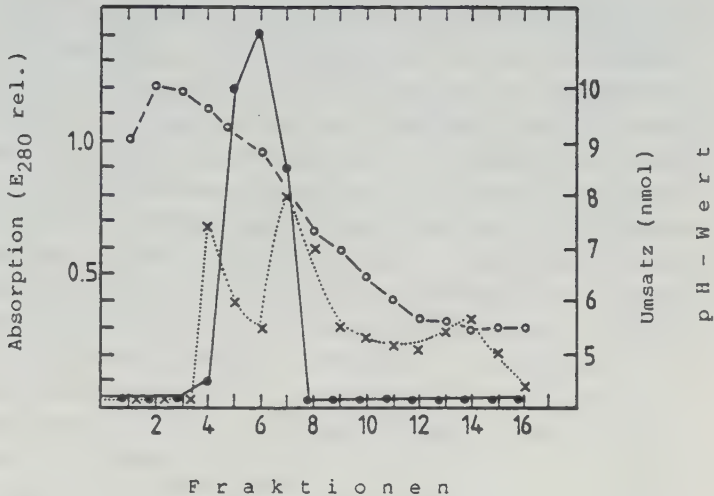


Abb. 36 Elutionsprofil der Säulen-Chromatofokussierung. Aufgegeben wurden 70 pkat eines gegen Aufgabepuffer dialysierten Rohextrakts (1.5 ml, 1.6 mg Protein/ml). (●) nmol Umsatz im Standardtest, (x) Absorption E₂₈₀, (○) pH Wert.

6.3.7. Nachweis des Cosubstrats für die Oxidation des Dihydromacarpins

Es wurde bereits erwähnt, daß die Enzymreaktion auch ohne Zusatz von Cosubstraten wie zum Beispiel NAD oder NADP ablief. Wie im Falle der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase kommt danach vor allem Sauerstoff als Cosubstrat in Betracht. Um die Beteiligung von Sauerstoff sicher nachzuweisen, sollte daher versucht werden, die Reaktion in den Standard-enzymtestansätzen durch Sauerstoffentzug zu unterdrücken. Hierzu wurden alle verwendeten Lösungen vor dem Zusammenpipettieren des Enzymtests 1 h lang mit

Helium begast. Für den Enzymtest wurde diesmal eine Substratkonzentration eingesetzt, die dreimal so hoch war wie die normalerweise eingesetzte. Auch die eingesetzte Enzymmenge (bislang 1 μg) wurde erhöht (3 μg Protein). Dies geschah, um einen möglichst großen Umsatz zu erzielen, da ein geringer Umsatz auf einer Restkonzentration an molekularem Sauerstoff im Testansatz hätte beruhen können. Diese Gefahr schien bei einem großen Umsatz zumindest geringer. Verwendet wurde ein 15 facher Reaktionsansatz. Als Reaktionsgefäße wurden HPLC-Probengefäße mit einem Volumen von 5 ml verwendet, die mit Teflonstopfen gasdicht verschlossen waren. Die Begasung des Reaktionsansatzes und der Austritt der eingeleiteten Gase wurde durch in die Teflonstopfen eingestochene Glaskapillaren erreicht. Nach dem Zusammengeben der einzelnen Komponenten des Testansatzes wurde auch dieser zunächst 1 h lang mit He begast. Während dieser Zeit wurden den Testansätzen aliquote Teile entnommen und der Umsatz bestimmt. Nach der angegebenen Zeit wurde die Heliumbegasung des Testansatzes durch eine Begasung mit reinem Sauerstoff ersetzt. Wieder wurden in Zeitabständen Proben zur Messung des Umsatzes entnommen. Abbildung 37 zeigt deutlich, daß während der Heliumbegasung kein Umsatz gemessen werden konnte. Nach Begasung mit Sauerstoff allerdings setzte ein deutlich meßbarer Umsatz ein, der linear mit der Zeit anstieg. Das Experiment weist deutlich nach, daß Sauerstoff direkt als Cosubstrat für die enzymatische Oxidation von Dihydromacarpin verwendet wird. Das Enzym ist damit zu recht als Oxidase bezeichnet worden.

Nicht geklärt werden konnte, ob das gebildete Produkt H_2O oder, wie im Falle der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase, H_2O_2 ist.

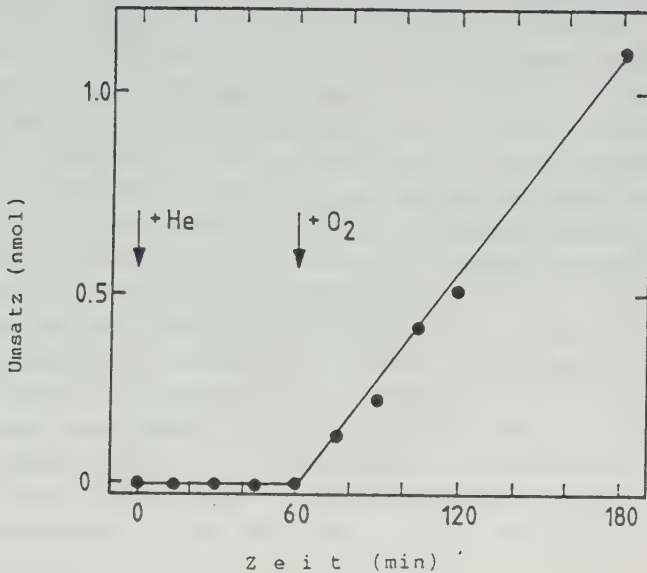


Abb. 37 Umsatz im Standardtestsystm bei Begasung mit He und mit O₂. Die Substratkonzentration war 0.1 mM; die zugesetzte Enzymaktivität 3.6 pkat.

6.3.8. Einfluß von Hemmstoffen auf die Enzymreaktion

Aufschlüsse über den Mechanismus und das möglicherweise daran beteiligte Coenzym einer enzymatisch katalysierten Reaktion können aus der spezifischen Wirkung von Hemmstoffen gezogen werden. Solche Untersuchungen waren 1985 von AMANN über die Reaktion der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase angestellt worden. Hierbei hatte sich diese Oxidase als ein Flavoenzym erwiesen. Spezifische Hemmstoffe für Flavoenzyme sind die Substanzen Morin und Dicoumarol. Im Standardenzymtest wurde nun versucht, die Hemmwirkung dieser Substanzen auf die Reaktion der Dihydromacar-

pin-Oxidase zu untersuchen. Dem Standardenzymansatz wurden hierzu 1.2 pkat Enzymaktivität zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten, die Reaktionstemperatur 37 °C. Die durch Zugabe von Morin erreichbare Hemmung bewegte sich in der auch für das STOX-Enzym beschriebenen Größenordnung. Zugabe von Morin in einer Endkonzentration von 1 mM führte zu einer 76 % Hemmung der Enzymreaktion. Eine Konzentration von 0.1 mM hemmte die Reaktion immerhin noch zu 30 %. Noch stärker war die Hemmwirkung des Dicoumarol. Hier führte die Zugabe in einer 0.1 millimolaren Konzentration schon zu einer 80 % Hemmung.

Ein anderer Hemmstoff für Enzymreaktionen ist das Ethylmaleinimid. Es reagiert mit freien SH-Gruppen. Die Zugabe dieser Substanz führte allerdings auch in 10 millimolarer Konzentration nicht zu einer Hemmung der Enzymreaktion. Die Bedeutung von SH-Gruppen für das reaktive Zentrum des Enzyms scheint daher gering zu sein.

Die Dialyse der Enzymlösung gegen Puffer, der in 10 mM Konzentration den Eisenkomplexierer 1,10-Phenanthrolin enthält, führt zu einem 30 prozentigen Aktivitätsverlust der Enzymlösung. Der Einsatz eines Puffers mit 1mM Phenanthrolin beeinflusst dagegen die Enzymaktivität nicht.

Zu den Versuchen zur Hemmung der Enzymaktivität muß abschließend gesagt werden, daß nur die Beteiligung eines Flavins als Coenzym an der Reaktion wahrscheinlich gemacht werden konnte; die Beteiligung von SH-Gruppen dagegen als unwahrscheinlich. Weitergehende Aussagen sind aufgrund der Experimente sicher nicht zu rechtfertigen. Vor allem die mögliche Beteiligung von Metallatomen konnte durch das Resultat des Phenanthrolin-Versuchs nicht geklärt werden.

6.3.9. Einfluß von Metallionen auf die Enzymreaktion

Aus dem zuvor beschriebenen Grund wurde der Einfluß von Metallionen auf die Enzymreaktion noch speziell untersucht. Hierzu wurde wieder eine Enzymaktivität von 1.2 pkat im Standardenzymtest, eine Reaktionsdauer von 30 Minuten und eine Reaktionstemperatur von 37 °C gewählt. In den Test wurde zur Vermeidung von Phosphationen Tris/HCl Puffer (1 M, pH 7.5) eingesetzt. Die Metallionen wurden als Chloride (mit Ausnahme von SnSO_4 und CuSO_4) in einer 10 millimolaren Endkonzentration im Enzymtest zugesetzt. Tabelle 12 faßt das Testergebnis zusammen.

Eine deutliche Hemmung der Enzymreaktion zeigte sich vor allem bei Zugabe von Fe^{2+} und Hg^{2+} . Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von Cu^{2+} und Co^{2+} zu einer Steigerung der Enzymaktivität. Im Falle des Kupferions sogar zu einer dreifach höheren Aktivität.

Metallion	Aktivität (%)	Metallion	Aktivität (%)
Li	100	Fe III	85
Mg	100	Ni	14
Cs	100	Zn	100
Ca	100	Sn	100
Mn	100	Hg	7
Fe II	15	Co	120
		Cu	300

Tab. 12 Hemmung der Dihydromacarpin Oxidase durch Zugabe von Metallionen zum Standardenzymtestansatz. Die Metallionen wurden als Chloride in den Test eingebracht. Sn und Cu wurde als Sulfat zugegeben. Die Endkonzentration im Enzymtest war 10 millimolar.

7. Untersuchungen zur Cytologie der induzierten
Alkaloidbildung bei Zellkulturen (Stamm W)
von Eschscholtzia californica

7.2. Mikroskopische Untersuchungen

Die pflanzliche Vakuole dient in vielen Fällen der Aufnahme von cytotoxischen Sekundärstoffen (MATILE 1984). Auch die Alkaloide, deren Synthese zumeist im Cytoplasma (DEUS-NEUMANN und ZENK 1984), aber auch in Plastiden (WINK und HARTMANN 1982) abläuft, werden in den Vakuolen abgelagert (MATILE 1978, DEUS und ZENK 1982, NEUMANN et al. 1983). Früher ist zumeist von einer passiven Einlagerung solcher Substanzen in die Vakuole durch einen Ionenfallenmechanismus ausgegangen worden. Die lipophilen Formen der Alkaloide sollten demnach durch Diffusion den Tonoplasten überwinden können und dann durch Protonierung in der leicht sauren Vakuole am Wiederaustritt gehindert werden (MÜLLER et al. 1976, NEUMANN et al. 1983, MATILE 1984). In der letzten Zeit wurde jedoch am hiesigen Institut sogar ein Transportsystem für Alkaloide durch den Tonoplasten gefunden. Es transportiert die Alkaloide nicht nur aktiv in die Vakuole, sondern ist darüberhinaus auch hochspezifisch für die in einer bestimmten Pflanze vorkommenden Alkaloide (DEUS-NEUMANN und ZENK 1984, DEUS-NEUMANN und ZENK 1986).

Einen Transport stark farbiger Substanzen durch vesikuläre Strukturen in die Vakuole beobachteten LANG und KOHLENBACH (1982) bei Protoplasten von Macleaya cordata. Vermutlich handelt es sich auch hier um Benzophenanthridinalkaloide.

In Zellen von Papaver somniferum, die durch Zusatz von Elicitoren zur vermehrten Bildung des Alkaloids Sanguinarin angeregt wurden, stellten EILERT et al.

(1985) neben einem Auftreten des Alkaloids im Medium, ebenfalls eine Fluoreszenz in der Zellvakuole fest, die auf eine Einlagerung des Alkaloids in dieses Zellkompartiment hindeutet.

Eine lichtmikroskopische Betrachtung von Zellen der hier verwendeten Zellkultur (Stamm W) von Eschscholtzia californica lieferte zunächst das typische Bild einer entdifferenzierten, pflanzlichen Suspensionszelle. Die zumeist länglichen Zellen bildeten zusammenhängende Zellfäden von zumeist 4 - 8 Einheiten (siehe Abbildung 38). Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse mit der Anregungswellenläng 266 nm zeigte eine schwach blaue Fluoreszenz der Zellen. Diese Fluoreszenz kann mit großer Sicherheit auf den Gehalt der Zellen an stark blau fluoreszierenden Dihydrobenzophenanthridinalkaloiden zurückgeführt werden. Die auftretende schwache Fluoreszenz (siehe Abbildung 39) scheint aber nicht in der Vakuole, sondern im Cytoplasma lokalisiert zu sein. Besonders deutlich wird dieser Verdacht bei der Betrachtung von Zellen, die durch Zugabe von Elicitor in der logarithmischen Wachstumsphase der Kultur, zu verstärkter Alkaloidproduktion angeregt wurden. Die in diesem Fall viel stärkere blaue Fluoreszenz ist deutlich sichtbar nicht in der Vakuole, sondern im Cytoplasma zu finden. Auch die jetzt auftretende rote Fluoreszenz der oxidierten Benzophenanthridinalkaloide ist nicht in der Vakuole lokalisiert (siehe Abbildung 40).

Eine genaue Lokalisation der auftretenden Fluoreszenz schien durch die Präparation von Protoplasten und Vakuolen der induzierten Zellen möglich.

Für den Versuch wurden zunächst Zellen von Stamm W der Eschscholtzia californica Zellkultur in der logarithmischen Wachstumsphase mit Elicitor versetzt (Endkonzentration im Medium 250 mg/l). Nach vier Wuchstagen



Abb. 38 Lichtmikroskopische Aufnahme eines Zellfadens einer Kultur von Stamm W



Abb. 39 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Zellfadens einer Kultur von Stamm W

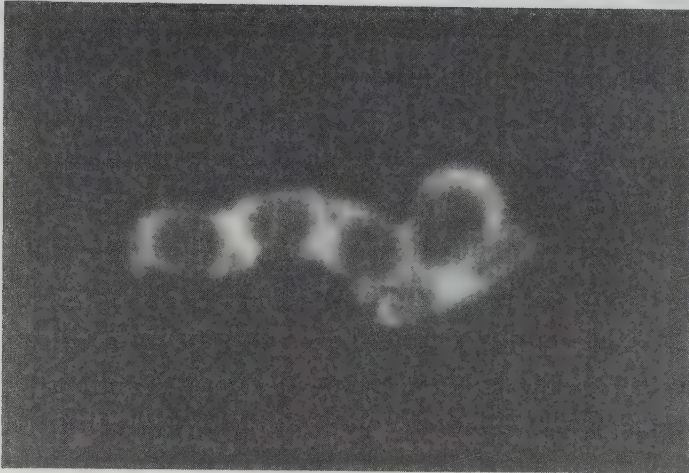


Abb. 40 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Zellfadens einer Kultur von Stamm W. Der Kultur war 4 Tage zuvor in der logarithmischen Wachstumsphase 250 mg/l Medium Hefelicitor zugesetzt worden.

wurden die Zellen für die Präparation von Protoplasten herangezogen. Hierzu wurden 15 g frische durch Vakuumfiltration gewonnene Zellen in 100 ml eines Enzymsatzes zur Verdauung der Zellwände gegeben. Der Enzymsatz enthielt 5 % des Enzyms *Myocellase*, 3 % *Pectinol D*, 0.25 M Mannit und 0.1 M CaCl_2 . Er wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 5.8 eingestellt. Der Ansatz wurde unter leichtem Schütteln 4 Stunden lang inkubiert. Danach wurde er zweimal durch Kunststoffsiebe abfiltriert; zunächst durch eines mit 850 μm dann durch eines mit 100 μm Porengröße. Anschließend wurde die Suspension in einer Tischzentrifuge mit Ausschwingrotor abzentrifugiert (10 min) und das Sediment je zweimal mit 50 ml einer Lösung aus Mannit (0.25 M) und CaCl_2 (0.1 M) gewaschen.

Eine fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der so

Eine fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der so gewonnenen Protoplasten zeigte nun eindeutig die Lokalisation der in den Zellen auftretenden Fluoreszenz im Plasmasaum der Protoplasten, während die großen Zentralvakuolen keine Fluoreszenz zeigten. Abbildung 41 (a und b) zeigt eine normale und eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der gewonnenen Protoplastensuspension. Hier und in der Großaufnahme eines einzelnen Protoplasten (Abbildung 42) wird aber auch deutlich, daß die blaue Fluoreszenz der Dihydrobenzophenanthridinalkaloide sich in granulärer Form im Cytoplasma befindet, während die rote Fluoreszenz der oxidierten Benzophenanthridinalkaloide ausschließlich im Kernbereich zu finden ist.

Zur letzten Absicherung der Beobachtungen wurden die Protoplasten zur Präparation von Vakuolen noch in ein Lysiermedium eingebracht. Es handelte sich dabei um einen Tris/HCl Puffer (20 mM, pH 8.0) der zusätzlich 10 mM NaEDTA, 0.03 % w/v PE 4000, 8 % w/v Ficoll und 0.2 M Mannit enthielt. Eine Reinigung der entstandenen Vakuolen erfolgte nicht. In der entstandenen Suspension konnten Vakuolen, Protoplasten und Zellen mit noch nicht vollständig abgebauten Zellwänden gleichzeitig beobachtet werden. Es zeigte sich, daß trotz deutlicher Fluoreszenz der Zellen und Protoplasten die entstandenen Vakuolen nicht mehr fluoreszierten (siehe Abbildung 43).

7.2. Elektronenmikroskopische Analyse von elicitor-behandelten Zellen von Stamm W

Die elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. G. Wanner vom Botanischen Institut der Universität München durchgeführt.

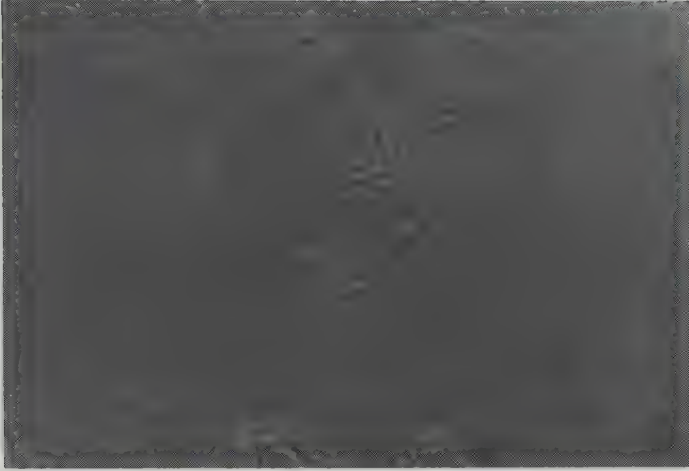


Abb. 41a Lichtmikroskopische Aufnahme einer Protoplastensuspension von Stamm W.



Abb. 41b Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Protoplastensuspension von Stamm W. Den zur Präparation der Protoplasten verwendeten Zellen war 4 Tage zuvor Hefeelicitator zugesetzt worden (250 mg/l Medium)



Abb. 42a Lichtmikroskopische Aufnahme eines einzelnen Protoplasten der aus Zellen von Stamm W präpariert wurde.

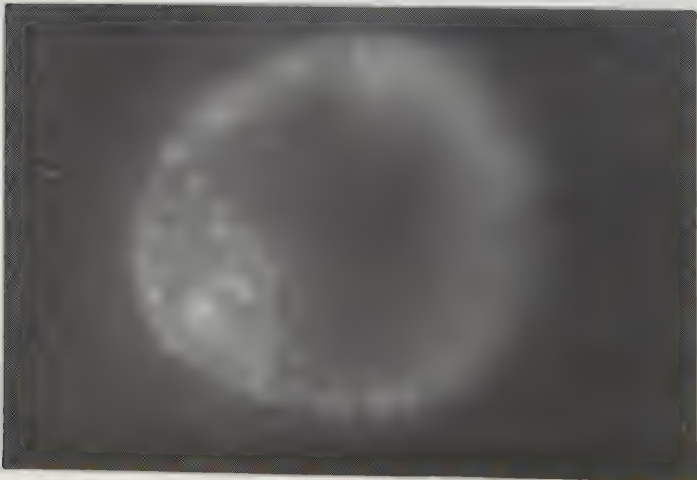


Abb. 42b Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines einzelnen Protoplasten der aus Zellen von Stamm W präpariert wurde. Der Kultur war 4 Tage zuvor Hefeelicitator zugesetzt worden.

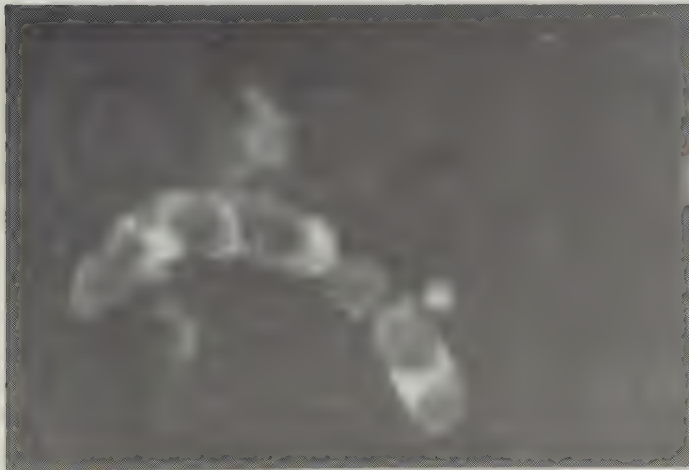


Abb. 43 Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Protoplastensuspension von Stamm W nach Zugabe von Lysiermedium. Der Kultur war 4 Tage zuvor Hefeelicitator zugesetzt worden. Die Vakuole (→) ist im fluoreszenzmikroskopischen Bild kaum noch zu sehen.

Es wurden Zellen von Stamm W, die in der logarithmischen Wachstumsphase mit Elicitor versetzt worden waren, zunächst fixiert.

Hierzu wurden 5 g durch Vakuumfiltration gewonnene Zellen für 1 h mit 20 ml Fixierpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Der Puffer enthielt Natriumcacodylat (75 mM) und $MgCl_2$ (2 mM). Er wurde auf einen pH-Wert von 6.0 eingestellt und anschließend im Verhältnis 8 : 1 mit einer 25 %igen Glutardialdehydlösung vermischt. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Zellen vorsichtig abzentrifugiert und dreimal mit 20 ml Puffer, dem kein Glutardialdehyd zugesetzt war, gewaschen. Zu der Zellsuspension wurde nun eine frische OsO_4 Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1.5 % gegeben. Nach zweistündigem Einwirken des OsO_4 wurden die nun dunkel verfärbten Zellen mehrfach mit Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte eine Kontrastierung mit Uranyl-magnesiumacetat (1 %) für eine Stunde. Das Präparat wurde jetzt in einer aufsteigenden Reihe mit wasserfreiem Aceton entwässert und in Standard-Einbettungsmedium (nach SPURR 1969, Modifikation A) aufgenommen. Das noch flüssige Kunstharz wurde in Gelatine-kapseln gefüllt und für 8 Stunden bei 70 °C ausgehärtet. Nach Ablösung der Gelatine in Wasser konnten Ultradünnschnitte (Diamantmesser, 50/70 nm Schnittdicke) angefertigt werden. Die Schnitte wurden auf zum Teil Kollodium-befilmte Kupfergrids aufgebracht und mit Bleicitrat nachkontrastiert (100 mmol, pH 12.6).

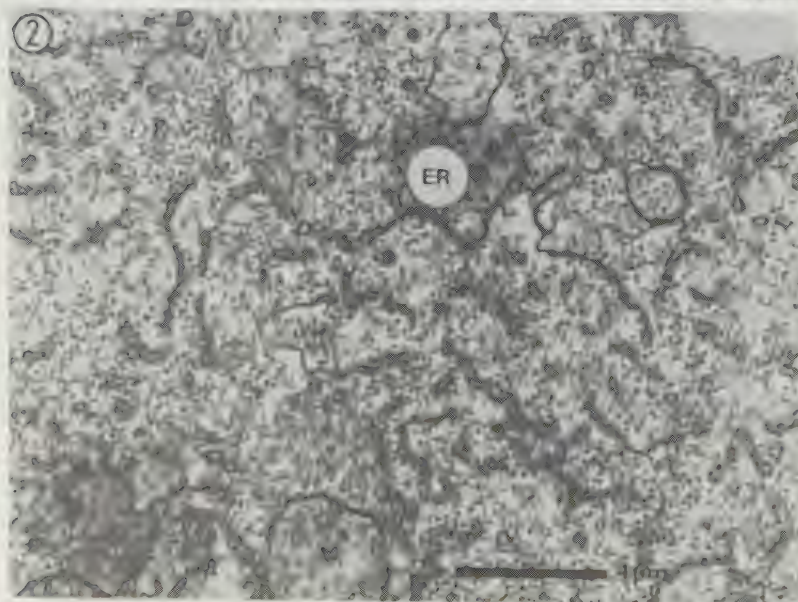
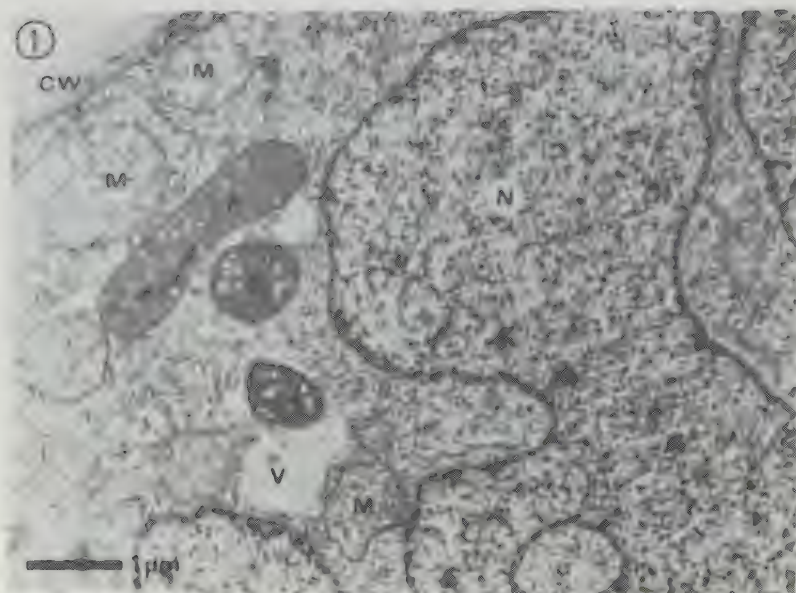
Die Auswertung der Bilder zeigte ein für pflanzliche Suspensionszellen typisches Bild. Die halb-automatisch planimetrische Analyse (MOP AM 02) des Volumenanteils einzelner Zellstrukturen am Gesamzellvolumen zeigte zunächst, daß der cytoplasmatische Bereich nur 10 % des Gesamzellvolumens ausmacht. 90 % des Zellvolumens nimmt die Vakuole ein. Vom cytoplasmatischen Teil nimmt der Zellkern den größten

Teil (10 %) ein. Mitochondrien machen 4 % des Cytoplasmavolumens aus. Wie bei den meisten heterotroph wachsenden Suspensionszellen finden sich keine voll entwickelten Plastiden. Die vorhandenen Proplastiden-ähnlichen Strukturen haben einen Anteil von 7 % am Cytoplasma. Ebenfalls nicht untypisch für Zellen einer Suspensionskultur ist die mit 0.1 - 0.2 μ m nur dünne Zellwand (siehe Tafel I). Gleiche Ergebnisse wie die hier beschriebenen lieferte auch eine elektronenmikroskopische Analyse der Zellen einer Suspensionskultur von Berberis wilsoniae var. subcaulialata, die AMANN et al. 1986 vornahmen.

Eine Besonderheit der untersuchten Zellen war das Auftreten einer großen Menge tubulären, endoplasmatischen Retikulums im Cytoplasma. Trotz des tubulären Charakters war es stark mit Ribosomen besetzt (siehe Tafel I).

7.3. Untersuchungen zur Kompartimentierung von Enzymaktivitäten

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigten hier erstmals das Verbleiben, selbst großer Mengen eines Alkaloids im Cytoplasma. AMANN et al. (1986) hatten aber erst kürzlich nachweisen können, daß wesentliche Teile der Biosynthese der Protoberberine in subzellulären, cytoplasmatischen Vesikeln kompartimentiert sind. Die Protoberberine können, nachdem sie in den Vesikeln oxidiert worden sind, infolge ihrer positiven Ladung die Membranen nicht mehr passieren. Ihr Transport in die Vakuole erfolgt wahrscheinlich durch Fusion der Vesikelmembran mit dem Tonoplasten. Diese Kompartimentierung wurde in Pflanzen von vier verschiedenen Familien festgestellt. Da die Biosynthese der Benzophenanthridine über die Vorstufe der



Tafel 1.

Tafel I.

1. Elektronenmikroskopisches Bild eines Dünnschnitts durch eine Zelle einer Suspensionskultur (Stamm W) von Eschscholtzia californica. Das Bild zeigt: (N) den pleomorphen Zellkern, (P) Proplastiden-ähnliche Plastiden, (M) Mitochondrien, (CW) die Zellwand, (V) einen Vakuolenanschnitt.
2. Ausschnittvergrößerung aus dem Cytoplasma einer Zelle der Suspensionskultur Stamm W von Eschscholtzia californica. Zu sehen ist hier typisches tubuläres rauhes endoplasmatisches Retikulum (ER).

Protoberberine abläuft und die Induktion eines der in den Vesikeln kompartimentierten Enzyme, des Berberin-Brücken-Enzyms, durch Elicitorzugabe in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, mußte auch in unserem Fall mit dem Auftreten solcher Vesikel gerechnet werden. Wäre die Fusion solcher Vesikel mit dem Tonoplasten gestört, würde das ein Verbleiben der Substanzen im Cytoplasma erklären.

Von den durch AMANN et al. (1986) in den vesikulären Kompartimenten gefundenen Enzymaktivitäten konnte nur eine, nämlich die des Berberin-Brücken-Enzyms auch in den Zellen von Stamm W Kulturen nachgewiesen werden. Der Nachweis einer (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase-Aktivität gelang nicht. Da die Kultur keine Protoberberine enthält sollte dieses Enzym hier auch nicht aktiv sein (vergl. RÜFFER und ZENK 1986). Anhand der Lokalisation der Berberin-Brücken-Enzym-Aktivität in einem Saccharose-Dichtegradienten sollte untersucht werden, ob die gleichen vesikulären Strukturen auch in diesem Fall vorliegen. Sie könnten Kompartimente sein, in denen die Sekundärstoffe in diesem Falle verbleiben bzw. abgelagert werden. Von den Enzymen, die Reaktionsschritte katalysieren, die biosynthetisch vor der Bildung der Berberin-Brücke liegen, also die Synthese des Retikulins katalysie-

ren, ist bekannt, daß sie nicht in vesikulären Strukturen vorkommen. Von Interesse war die Klärung der Frage, ob auch der letzte biosynthetische Schritt auf dem Weg zu den Benzophenanthridinalkaloiden, die Oxidation, in Vesikeln kompartimentiert ist.

Untersucht werden sollte also die Verteilung der Alkaloide und der Aktivitäten des Berberin-Brücken-Enzyms und der Dihydromacarpin-Oxidase in einem Saccharose-Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation.

Für die Untersuchung wurden 10 g frische Zellen von Stamm W schonend, das heißt isotonisch aufgeschlossen (siehe Kapitel II. 2.6.), um die Zerstörung von subzellulären Strukturen zu verhindern.

5 ml von der durch Zellaufschluß gewonnenen Suspension aus Zellorganellen wurde nun auf einen linearen Saccharose-Dichtegradienten von 20 - 40 % w/w Saccharose geschichtet. Am Boden des Zentrifugenbeckers befand sich ein Kissen von 5 ml Volumen der schwereren Komponente (40 % w/w Saccharose). Der Zucker war gelöst in einem Puffer, der Tricin (50 mM) und Na_2EDTA (1 mM) enthielt und mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt war. Nach einer 4 stündigen Zentrifugation (bei 4 °C, Rotor: SW 25.2, Spinco, USA) bei 100 000g wurde der Gradient vom Boden her mit einer peristaltischen Pumpe abgesaugt. Er wurde in Fraktionen zu 1.6 ml aufgefangen. Hierbei entstanden insgesamt 30 Fraktionen. Die Fraktionen wurden anschließend refraktometrisch auf ihren Zuckergehalt getestet. Der Proteingehalt wurde nach BRADFORD (1976) bestimmt und die Enzymaktivitäten von Berberin-Brücken-Enzym und Dihydromacarpin-Oxidase mit den beschriebenen Testverfahren (siehe Kapitel II. 2.3.). Die Testverfahren wurden folgendermaßen modifiziert: In den Standardtestansatz für das Berberin-Brücken-Enzym wurde zur Verbesserung der Sensitivität und Genauigkeit mit dem Tritium-markierten Substrat eine Radioaktivität von 114 000 dpm eingebracht. Die

Konzentration an unmarkiertem Substrat wurde nicht verändert; beim Test auf Dihydromacarpin-Oxidase-Aktivität wurde ebenfalls die eingesetzte Radioaktivität pro Standardenzymansatz auf 86000 dpm erhöht. Die Reaktionszeit betrug für beide Tests 60 Minuten; die Reaktionstemperatur war 37 °C. In die Standardtestansätze zur Messung der beiden Enzymaktivitäten wurden jeweils 200 µl der beim Auspumpen des Gradienten gewonnenen Fraktionen eingesetzt.

Der Versuch wurde in gleicher Weise mit normalen Zellen von Stamm W, geerntet am Ende der logarithmischen Wachstumsphase, durchgeführt, als auch mit solchen Zellen, denen 4 Tage zuvor, nämlich zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase, Elicitor zugesetzt worden war (Endkonzentration im Medium 250 mg/l). Beim Aufschluß normalen Gewebes zeigten sich nach Zentrifugation im Gradienten keinerlei, im sichtbaren Licht absorbierenden Banden. Lediglich eine leichte blaue Fluoreszenz im Überstand des Gradienten war bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 280 nm zu bemerken. Im Falle der Aufarbeitung des zuvor elicitorbehandelten Gewebes allerdings traten zwei sehr scharfe, rot gefärbte Banden auf (siehe Abbildung 44). Abbildung 45 zeigt die Lokalisation der gemessenen Enzymaktivitäten im Saccharosegradienten, einmal für den Aufschluß einer nicht behandelten und dann für den Aufschluß einer elicitorbehandelten Kultur. Eingezeichnet ist außerdem das Ergebnis des Proteintests und die gefundenen roten Banden. Es zeigt sich, daß die Behandlung der Kultur mit Elicitor die Dichte, bei der die gemessenen Enzymaktivitäten im Saccharosegradienten gefunden werden, nicht beeinflußt. Die gemessenen Enzymaktivitäten sind im Falle der elicitorbehandelten Kultur deutlich höher. Die Aktivität des Berberin-Brücken-Enzyms wird bei einer Dichte gefunden, bei der auch die von AMANN et al. (1986) beschriebenen Vesikel sedimentieren. Eine opake Zone

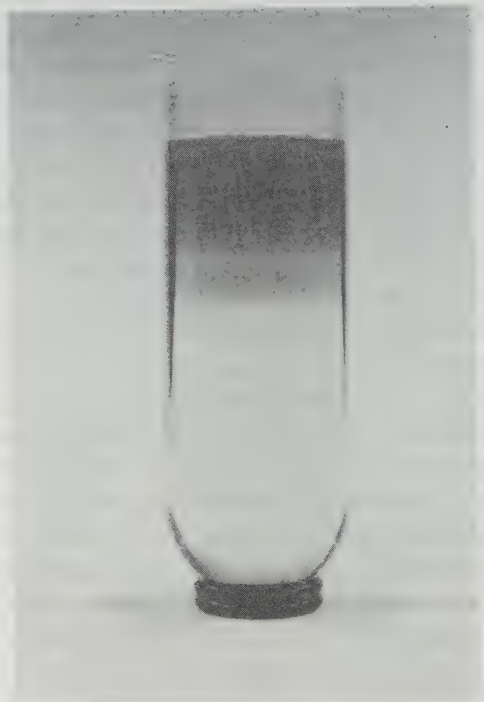


Abb. 44 Photo eines Saccharose-Dichtegradienten nach Auftrennung eines Aufschlusses von Stamm W Zellen. Der Aufschluß erfolgte nach BREIDENBACH et al. (1967). Der Kultur war vier Tage zuvor Hefeelicitator zugesetzt worden.

im Bereich dieser Dichte, die das Vorhandensein von Vesikeln angedeutet hätte, war nicht zu sehen. Die Aktivität der Dihydromacarpin-Oxidase wurde allerdings zum größten Teil im Überstand des Gradienten gemessen. Weder die Dichte bei der das Maximum der Berberin-Brücken-Enzym-Aktivität noch bei der das Maximum der Dihydromacarpin-Oxidase-Aktivität gemessen wurde, stimmten aber mit der Dichte der rot gefärbten Banden überein. Das Versuchsergebnis zeigt,

- E l i c i t o r + E l i c i t o r

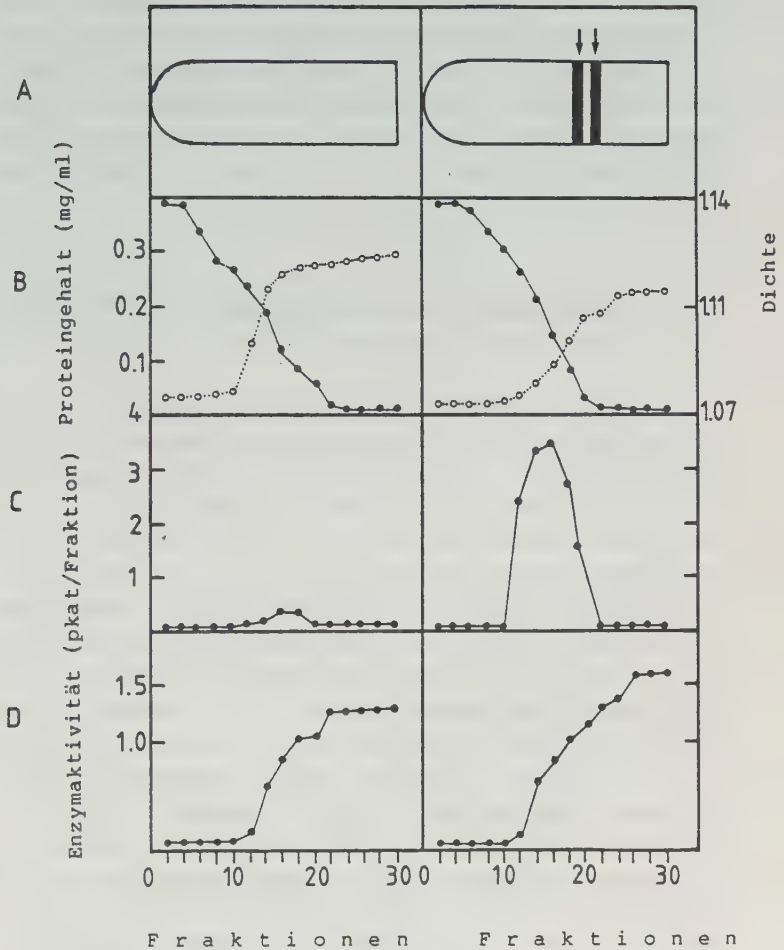


Abb. 45 Dichteprofil des Saccharose-Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation eines Rohextraktes von Stamm W der Eschscholtzia Kultur
A Lokalisation der roten Banden (→),
B Dichte (●) und Proteingehalt (○)
C Berberin-Brücken-Enzym-Aktivität (●)
D Dihydromacarpin-Oxidase-Aktivität (●)

daß auch bei dieser Zellkultur das Berberin-Brücken-Enzym nicht frei im Cytosol liegt, sondern sehr wahrscheinlich in Vesikeln. Die gesamte Biosynthese der oxidierten Benzophenanthridinalkaloide läuft aber wahrscheinlich nicht in jenen Vesikeln ab, da die getestete Oxidase-Aktivität im Gradienten-Überstand gemessen wurde. Eine Erklärung für das Auftreten der roten Banden bei Aufschluß der mit Elicitor versetzten Kultur lieferte dieser Versuch nicht.

7.4. Untersuchung des Alkaloidgehaltes im Saccharose-Dichtegradienten

Um festzustellen, ob die beobachteten scharfen roten Banden im Saccharose-Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation Alkaloide enthielten und welche, wurde der Versuch zunächst wie beschrieben mit elicitorbehandelten Zellen wiederholt. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Gradient allerdings nicht von unten mit einer peristaltischen Pumpe abgesaugt. Statt dessen wurden die Zentrifugenbecher in Höhe der roten Banden mit einer heißen Injektionskanüle angestochen und der Inhalt seitlich ausgetropft. Dies ermöglichte ein konzentriertes Aufnehmen der Banden, die beim Absaugen des Gradienten verdünnt worden wären. Pro Bande stand ein Volumen von 500 µl zum Nachweis eines möglichen Alkaloids zur Verfügung. Ein Alkaloidnachweis bzw. die Analyse der Alkaloidzusammensetzung sollte mit Hilfe der HPLC-Methode erfolgen. Um etwa vorhandene Vesikel aufzubrechen, die eine HPLC-Analyse durch Rückhalten der Alkaloide hätten stören können, wurde die gewonnene Flüssigkeit mit N₂ (l) schockgefroren und anschließend wieder aufgetaut. Danach wurden 100 µl in das HPLC-Trennsystem injiziert und getrennt. Es zeigte sich, daß die

beobachteten roten Banden in der Tat oxidierte Benzophenanthridinalkaloide enthielten, nämlich Chelirubin und Macarpin in einem Verhältnis von 14 % zu 86 %. Dies entsprach exakt der Produktzusammensetzung, die auch für das Ausgangsgewebe gemessen worden war. Dem Saccharosegradienten unmittelbar über bzw. unter den Banden entnommene Flüssigkeit enthielt keine Alkaloide.

7.5. Elektronenmikroskopische Analyse der roten Banden im Saccharose-Dichtegradienten

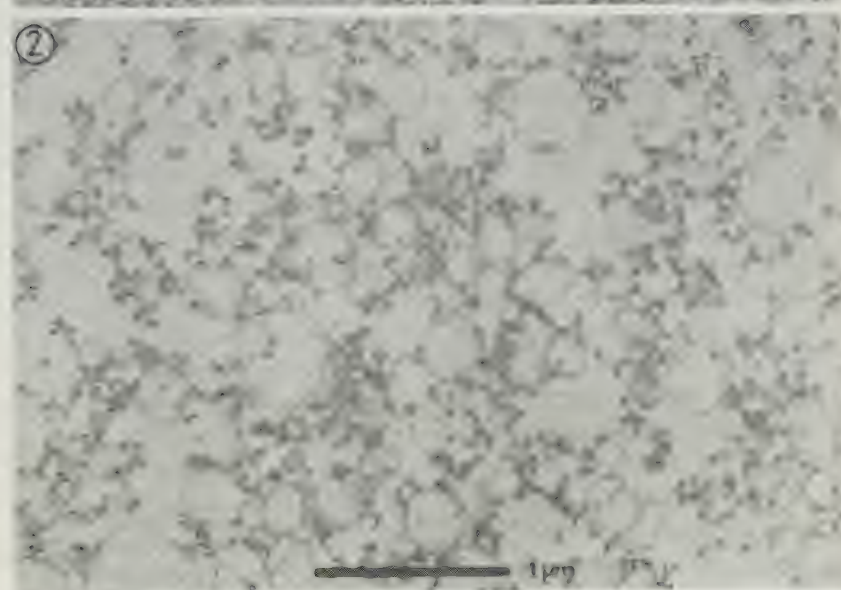
Die roten Banden im Saccharose-Dichtegradienten entsprachen wegen der Verteilung der Aktivität des Berberin-Brücken-Enzyms und des am Ort ihres Auftretens im Gradienten gemessenen Zuckergehaltes nicht den von AMANN et al. (1986) beschriebenen Vesikeln. Andererseits waren am Ort ihres Auftretens oxidierte Benzophenanthridinalkaloide in der gleichen Zusammensetzung ihres Vorkommens im Gewebe konzentriert. Durch eine elektronenmikroskopische Analyse sollte geklärt werden, ob im Bereich dieser Banden subzelluläre Strukturen auftreten, die der Speicherung von Alkaloiden dienen könnten.

Vorversuche hatten gezeigt, daß durch Weglassen des Osmotikums im Aufschlußpuffer und Anwendung eines linearen Gradienten von 0 - 40 % w/w Saccharose nur noch eine rote Bande auftrat. Zur Vereinfachung des Problems wurde für die elektronenmikroskopische Analyse ebenso verfahren. Die Untersuchungen wurden wieder in Zusammenarbeit mit Dr. G. Wanner, Botanisches Institut der Universität München, durchgeführt.

Die rot gefärbte Bande wurde wieder durch seitliches Anstechen des Zentrifugenbechers mit einer Kanüle und Austropfen in sehr konzentrierter Form

erhalten. Das erhaltene Volumen betrug 1.5 ml. Durch HPLC-Analyse wie beschrieben wurde wiederum nachgewiesen, daß die Bande die oxidierten Benzophenanthridine enthielt. Zum verbliebenen Volumen der ausgetropften Bande wurde nun das gleiche Volumen einer Pufferlösung zugesetzt. Sie enthielt Natriumcacodylat (280 mM) und $MgCl_2$ (2 mM); ihr pH-Wert war 6.0. Zur Fixierung wurden anschließend 350 µl einer 25 %igen Glutardialdehyd-Lösung zugesetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Lösung mit 50 ml Natriumcacodylatpuffer ohne Glutardialdehyd verdünnt. Die verdünnte Lösung wurde nun erneut 4 h bei 100 000 g zentrifugiert (4 °C, Rotor: SW 25.2, Spinco, USA). Hierdurch sollten mögliche subzelluläre Strukturen pelletiert werden. In der Tat zeigte sich ein stark rot gefärbtes Pellet am Boden des Zentrifugenbechers. Das Pellet wurde noch einmal mit dem Natriumcacodylatpuffer gewaschen, um Glutardialdehyd zu entfernen. Es wurde zuletzt in 500 µl Waschpuffer resuspendiert und durch Zugabe des gleichen Volumens einer frischen 2 %igen OsO_4 Lösung nachfixiert. Nach 2.5 Stunden wurde zur Entfernung überschüssigen Osmiumtetroxids gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert. Wie in III. 7.2. beschrieben erfolgte das Einbetten und Schneiden des Präparates.

Schon eine Übersichtsaufnahme des Präparats (Tafel II.) zeigte eine große Homogenität. Trotz der relativ einfachen Präparationsmethode enthielt das Präparat auch keine vereinzelt auftretenden Zellorganellen mehr. Eine Aufnahme mit stärkerer Vergrößerung (Tafel II.) lies deutlich werden, daß im vorliegenden Präparat nur Bruchstücke rauhen, endoplasmatischen Retikulums zu sehen sind. Zwar sind hier und da auch vesikuläre Strukturen zu sehen. Die Membranen solcher Vesikel sind aber mit Ribosomen besetzt und weisen sich daher als rER-Membranen aus.



Tafel II.

Tafel II

Elektronenmikroskopisches Übersichtsbild des durch Pelletierens der aus dem Saccharose-Dichtegradienten isolierten roten Banden gewonnenen Präparates

1. Bei geringer Vergrößerung zeigt sich die große Homogenität des Präparates.
2. Bei stärkerer Vergrößerung zeigen sich vesikuläre und granuläre Strukturen des rauen endoplasmatischen Retikulums.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten deutlich, daß es sich bei den roten Banden, die bei Auftrennung eines Rohextraktes von elicitorbehandelten Zellen auftreten, um rauhes endoplasmatisches Retikulum und nicht um Vesikel wie sie von AMANN et al. (1986) beschrieben wurden, handelt. Für diesen Befund spricht auch die hohe Schärfe der Banden im Saccharose-Dichtegradienten. Da die Größe von Vesikeln in der Regel stärker schwankt, wären in diesem Fall auch weniger scharfe Banden zu erwarten gewesen. Schließlich erklärt das Auftreten der oxidierten Benzophenanthridinalkaloide auch die lichtmikroskopische Beobachtung, daß bei Zellen von Stamm W nach Zusatz von Elicitor rote Fluoreszenz vor allem im Bereich des Zellkerns auftritt. Das rauhe endoplasmatische Retikulum tritt im Cytoplasma sicherlich im Bereich des Zellkerns auf. Ein möglicher Mechanismus für die Bindung der oxidierten Benzophenanthridine an das rauhe ER bestünde in einer Einlagerung der Alkaloide in Sekundärstrukturen der ribosomalen RNA. Im letzten Biosyntheseschritt, der Oxidation der Dihydrobenzophenanthridine, erhalten die Moleküle gleich zwei, für Interkalation mit der Sekundärstruktur von Ribonucleinsäuren wichtige Eigenschaften, nämlich erstens eine positive Ladung und zweitens eine voll-

kommen planare Struktur. Es wäre demnach verständlich, warum die nicht interkalierenden Dihydrobenzophenanthridine im Cytosol verteilt sind und die oxidierten Benzophenanthridine bzw. die rote Fluoreszenz nur im Bereich der Zellkerne auftritt. Interkalation würde aber bedeuten, daß mit größter Wahrscheinlichkeit nicht nur das raue endoplasmatische Retikulum um den Kern herum, sondern auch der Zellkern selbst rot gefärbt sein sollte. Untersuchungen hierüber sind in Vorbereitung. Die genannten Überlegungen eröffnen interessante Fragestellungen für die Zukunft.

IV. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Bildung von Benzophenanthridinalkaloiden durch Zellkulturen von Eschscholtzia californica. Hierbei wurde vor allem mit varianten Stämmen dieser Pflanzenart, aber auch mit Zellkulturen verwandter Arten gearbeitet. Unerläßlich scheint aber zunächst auch eine Analyse der von der Ganzpflanze selbst gebildeten Naturstoffe. Die Analyse der Inhaltsstoffe von Ganzpflanze und Zellkultur standen am Anfang dieser Arbeit. Die Untersuchungen zu diesem Thema wurden mit Hilfe der Methode der Reversed Phase HPLC durchgeführt.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Reversed Phase HPLC-System bietet hierbei anderen Trenn- und Quantifizierungsmethoden gegenüber erhebliche Vorteile. Bislang praktizierte Methoden der Isolierung und Trennung von Benzophenanthridinen (SLAVIK und SLAVIKOVA 1955 a,b,c, TAKAO et al. 1983) sind zum Teil sehr aufwendig und waren daher zur Untersuchung großer Probenmengen ungeeignet. Außerdem besteht bei derart aufwendigen Aufarbeitungsmethoden im Falle der Benzophenanthridinalkaloide die Gefahr der Oxidation möglicherweise auftretender Dihydroverbindungen. Das erschwert eine exakte quantitative Aussage über die Verteilung von oxidierten und reduzierten Benzophenanthridinen. Ein von BERLIN et al. (1983) vorgestelltes HPLC-System auf der Basis underivatisierten Silicagel-Trennmaterials gestattet zwar eine wesentlich schnellere Analyse als frühere Methoden, erfordert aber immer noch eine umfangreichere Probenvorbereitung als das hier vorgestellte Trennsystem. Darüberhinaus weisen BERLIN et al. (1983) reduzierte und oxidierte Benzophenanthridine in zwei getrennten

Systemen mit zwei verschiedenen Laufmittelsystemen nach.

Das in dieser Arbeit angewendete Trennsystem ermöglicht aber den gleichzeitigen Nachweis und die Quantifizierung von oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden und ihren Dihydroformen. Es erfordert über die Extraktion des zu untersuchenden Gewebes hinaus keine weitere Probenvorbereitung. Dies gestattet einen hohen Probendurchsatz, der für physiologische Untersuchungen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, unerlässlich ist, und senkt darüberhinaus auch die Gefahr der Bildung von Artefakten. Die Trennung unter leicht sauren Bedingungen löst noch ein weiteres Problem beim Nachweis der Benzophenanthridine. Oxidierte Benzophenanthridinalkaloide bilden unter neutralen bzw. basischen Bedingungen leicht Alkoxyderivate (Pseudobasen) an der Position 8 des Moleküls. Dies verändert Farbe und Fluoreszenz der Verbindungen und auch ihr Laufverhalten bei Dünnschichtchromatographie derart, daß sie nur schwer von den Dihydroverbindungen zu unterscheiden sind. Darüberhinaus liegt unter solchen Bedingungen meist ein Gleichgewicht der Alkaloide und ihrer Alkoxyderivate vor. Unter den hier beschriebenen Bedingungen treten diese Derivate nicht auf. Verwechslungen der Alkoxyderivate oxidierter Benzophenanthridinalkaloide mit ihren Dihydroverbindungen sind also ausgeschlossen.

Die ersten in Eschscholtzia californica sicher nachgewiesenen Alkaloide waren Protopin und Allocryptopin. Sie wurden im Jahr 1901 isoliert. Schon damals wurden zwei weitere nicht näher bestimmte Alkaloide gefunden. SLAVIK und SLAVIKOVA (1955b) konnten zeigen, daß es sich dabei um Sanguinarin und Chelerythrin handelte. Im gleichen Jahr hatten dieselben Autoren in Extrakten der Pflanze Chelidonium majus zwei neue Alkaloide nämlich Chelirubin und Chelilutin entdeckt (SLAVIK und SLAVIKOVA 1955a). Die Alkaloide

wurden auch in Eschscholtzia nachgewiesen. Schon SLAVIK und SLAVIKOVA (1955b) zeigten einen deutlichen Unterschied im Alkaloidspektrum von Wurzel und oberirdischen Pflanzenteilen. Neben dem Auftreten von Protopin und - bzw. - Allocryptopin in beiden Fällen, war der Gehalt der Wurzel an Benzophenanthridinalkaloiden 10 mal höher als der der oberirdischen Pflanzenteile. Gefunden wurden vor allem Sanguinarin und Chelerythrin. In der Wurzel traten Sanguinarin und Chelerythrin im Verhältnis 7:3, in oberirdischen Pflanzenteilen im Verhältnis 7:6 auf. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse decken sich in dieser Hinsicht recht gut mit denen von SLAVIK und SLAVIKOVA (1955b). Allerdings ist das von uns ermittelte Verhältnis von Sanguinarin und Chelerythrin in der Wurzel 5.5 : 4.5, während in den oberirdischen Pflanzenteilen Sanguinarin das einzige meßbare Benzophenanthridinalkaloid war. Der von uns gemessene Unterschied im Benzophenanthridingehalt von Wurzeln und oberirdischen Pflanzenteilen ist zudem geringer und beträgt nur Faktor 5.

Nach BERLIN et al. (1983) kommen die Benzophenanthridinalkaloide natürlich nur in Form ihrer Dihydroformen vor. Die Autoren schreiben: "Benzophenanthridine alkaloids occur naturally as dihydro compounds which may easily oxidize during the preparation in an anforeseeable ratio". Eine teilweise Oxidation von Dihydrobenzophenanthridinen bei der Isolierung kann sicher nicht ausgeschlossen werden, für das ausschließliche Vorkommen von Dihydrobenzophenanthridinen in der Natur ließen sich aber weder in unserer Arbeit noch in der Literatur Hinweise finden (TAKAO et al. 1983). Entsprechend ihrer Auffassung geben BERLIN et al. (1983) einen Anteil von 80 % Dihydro-sanguinarin am Gesamtalkaloidgehalt der Wurzel an. Da die Wurzel der Pflanze beim Anschneiden eine deutlich gelb-rote Farbe zeigt, scheint der ausschließliche

Gehalt an farblosem Dihydrosanguinarin offensichtlich falsch zu sein. Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse BERLINS könnte eine Verwechslung von Alkoxyderivaten oxidiertter Benzophenanthridine mit ihren Dihydroformen sein. Solche Derivate könnten bei Extraktion mit MeOH leicht entstehen.

Das im Jahr 1955 von SLAVIK und SLAVIKOVA (1955d) erstmals isolierte Alkaloid Macarpin, sowie die Alkaloide Chelirubin und Chelilutin sind aber nach dem übereinstimmenden Ergebnis aller Untersuchungen nur in sehr viel geringerer Konzentration in der Ganzpflanze vorhanden als die hauptsächlich vorkommenden Benzophenanthridinalkaloide Sanguinarin und Chelerythrin.

Ein ganz anderes Bild ergibt die Analyse von Zellkulturen. Alle aus Zellkulturen von Eschscholtzia californica gewonnenen Stämme enthielten Dihydromacarpin als Hauptalkaloid. An oxidierten Benzophenanthridinen wurden vor allem Macarpin (Stamm TR, Stamm W) und Chelirubin (Stamm R, Stamm G) als Hauptkomponenten gefunden. Sanguinarin und Chelerythrin kamen nur in Spuren vor. Der höchste Gehalt an diesen Substanzen wurde mit einem Anteil von 3 % bei Sanguinarin und 4.3 % bei Chelerythrin an der Gesamtmenge der Benzophenanthridinalkaloide in Zellen von Stamm TR gemessen. Dieses vom Produktspektrum der Ganzpflanze stark abweichende Substanzspektrum wird auch von anderen Autoren in Zellkulturen beschrieben. BERLIN et al. (1983) arbeiteten ebenfalls mit Zellkulturen von Eschscholtzia californica und fanden dort 8 % Dihydrosanguinarin, 46 % Dihydrochelirubin und 45 % Dihydromacarpin. Ob in jedem Fall nur die Dihydroformen auftreten, mußte auch hier bezweifelt werden. TAKAO et al. (1983) isolierten aus Zellkulturen von Macleaya cordata nach Reduktion des gesamten Extraktes mit NaBH_4 48 % Dihydrosanguinarin, 23 % Dihydrochelirubin und 27 % Dihydromacarpin. Auch hier

waren Sanguinarin und Chelerythrin die hauptsächlichen Benzophenanthridinalkloide der Ganzpflanze. Schon 1974 hatten IKUTA et al. ebenfalls bemerkt, das Zellkulturen von Macleaya cardata kein Chelerythrin mehr enthielten.

Vergleicht man also das Ergebnis dieser Arbeit mit früheren, läßt sich allgemein feststellen, daß in Zellkulturen, die stärker methoxylierten Benzophenanthridine Chelirubin und Macarpin in höherer Konzentration auftreten als in der Ganzpflanze während Sanguinarin und vor allem Chelerythrin hier weniger bedeutsam sind.

Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang ein Befund der in Kapitel III 5.2 dieser Arbeit geschildert wurde. Bei Verwundung von Sproßstückchen etiolierter Keimlinge wurde im Verwundungsbereich eine Steigerung des Gehaltes an oxidierten Benzophenanthridinen festgestellt. Das im Bereich solcher Verwundungen gemessenen Produktspektrum entsprach hierbei sehr viel mehr dem in Zellkulturen als dem in normalerweise in in ganzen Pflanzen gemessenen. Es ist: 8.5 % Sanguinarin, 19.8 % Chelerythrin, 38.6 % Chelirubin und 32.9 % Macarpin.

Das in dieser Arbeit zur Hauptsache untersuchte Phänomen, ist die Steigerung des Benzophenanthridingehaltes bei Zellkulturen von Eschscholtzia californica nach Pilzinfektionen. Bemerkt worden war das Phänomen wegen der Rotfärbung infizierter, normalerweise weiß gefärbter Kulturen von Stamm W. Da der Effekt nicht nur bei Infektion mit nativen Pilzen beobachtet werden konnte, sondern auch nach Zugabe von autoklaviertem Pilzmycel, war die Bildung einer roten Substanz durch den Pilz ausgeschlossen. Die Rotfärbung mußte auf eine Syntheseleistung der Zellen von Stamm W zurückgeführt werden. Wegen der Ähnlichkeit mit rot gefärbten Kulturen von Stamm TR wurde

zunächst die Arbeitshypothese entwickelt, die Pilzinfektion löse in den Zellen eine Syntheseleistung aus, die den weißen Kulturen durch Selektion verlorengegangen ist, und die Kulturen von Stamm TR noch besitzen. Diese Annahme konnte schnell widerlegt werden, da auch die ohnehin rot gefärbten Stamm TR-Zellen durch eine Pilzinfektion zu vermehrter Alkaloidproduktion stimuliert werden. Dieser Umstand rückte das beobachtete Phänomen in die Nähe des von MÜLLER et al. im Jahre 1940 entwickelten Phytoalexin-konzeptes. Die hier vermehrt gebildeten Substanzen müßten um als Phytoalexine nach der Definition Müllers angesprochen zu werden zwei Kriterien erfüllen. Zum einen muß ihre Bildung postinfektionell erfolgen, das heißt nach Kontakt mit einem Pilz bzw. mit einem Elicitor (KEEN 1972), zum anderen müssen sie der Infektabwehr dienen. Eine antimikrobielle (STERMITZ et al. 1973 und 1975) Wirkung ist für Sanguinarin und Chelerythrin festgestellt worden. Über biocide Wirkungen der hier vor allem gebildeten Substanzen Chelirubin und Macarpin ist nichts bekannt, eine ähnliche Wirkung ist aber zumindest anzunehmen. Die postinfektionelle Bildung der Benzophenanthridine oder zumindest doch ihre vermehrte postinfektionelle Bildung durch die Zellkulturen konnte nachgewiesen werden. (Kapitel III. 5.3.). Allerdings stellen Zellkulturen in diesem Zusammenhang wohl ein sehr artifizielles System dar. In einer Reihe von Fällen werden in Pflanzen gefundene Phytoalexine auch von deren Zellkulturen gebildet. Beispiele hierfür sind die Synthese von Rishitin durch Zellkulturen von Solanum tuberosum (BRINDLE et al. 1983), die Bildung von Sesquiterpen-Aldehyden durch Zellkulturen von Gossypium arboreum (HEINSTEIN et al. 1985) oder das bekannte Beispiel der Glyceollin-Bildung von Sojabohnen-Zellkulturen (MIETH et al. 1985).

Andererseits stellen pflanzliche Zellkulturen bio-

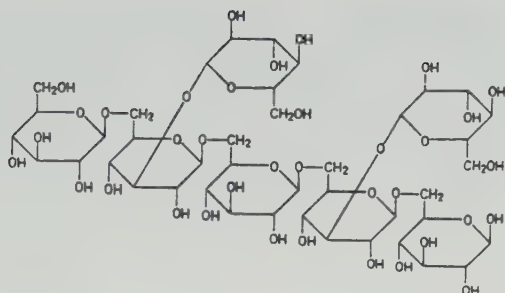
logische Systeme dar, deren Sekundärstoffproduktion durch eine Vielzahl von Substanzen in der einen oder anderen Weise beeinflußt werden kann. Konzepte zur Steigerung des Sekundärstoffgehaltes sind in der Einleitung ausführlich geschildert worden. Auf der Basis solcher Konzepte untersuchten auch BERLIN et al. (1983) die Bildung von Benzophenanthridinalkaloiden in Zellkulturen von Eschscholtzia californica. Sie fanden eine Steigerung des Alkaloidgehaltes um das siebenfache bei einer Erhöhung des Zuckergehaltes im Medium auf 8 %. Ein Einfluß des Phosphatgehaltes wurde ebenfalls festgestellt. Schließlich erzielten sie eine vierfache Steigerung des Alkaloidgehaltes durch Entfernung des Pflanzenhormons 2,4 D oder durch Zugabe des Pflanzenhormons BAP zu hormonfreiem Medium. Gerade der Einfluß von Pflanzenhormonen auf die Bildung von Sekundärstoffen ist ein häufig beschriebenes Phänomen (TABATA et al. 1971, ZENK et al. 1975). Anders als Medienbestandteile, wie Zucker oder Phosphat, wirken sie schon in sehr kleinen Konzentrationen. Die von uns beobachtete Steigerung des Benzophenanthridingehaltes der Zellkulturen durch Eintrag von Pflanzenhormonen oder ähnlicher Verbindungen mit den Pilzen oder Pilzextrakten konnte nicht von vorneherein ausgeschlossen werden. Klassische Beispiele für das Auftreten von Pflanzenhormonen in phytopathogenen Organismen sind die Bildung von Gibberellinen durch den Ascomyceten Gibberella fujikuroi und das Auftreten von Cytokininen in Corynebacterium fascians.

Aufgrund der Untersuchungen die zur Charakterisierung (Kapitel III. 3.) der wirksamen Komponente in den Pilzextrakten angestellt wurden, kann jedoch eindeutig ausgeschlossen werden, daß es sich um eine rein niedermolekulare Komponente handelt. Dies zeigt im einfachsten Fall die Dialyse. Die "Elicitor"-Aktivität, das heißt die Substanzen, die zu einer

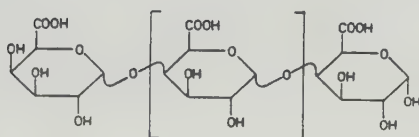
stimulierten Alkaloidbildung führen, verliessen den Dialyseschlauch nicht oder nur zu einem sehr geringen Teil. Eine niedermolekulare Komponente mit Hormoncharakter sollte sich auch nicht durch eine Ethanolfällung konzentrieren lassen. Am eindrucksvollsten aber beweist die Analyse der Pilzextrakte mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie, daß eine niedermolekulare Komponente ausgeschlossen ist. Diese Versuche zeigten aber auch, das nicht eine einheitliche Substanz vorliegt, die eine stimulierte Alkaloidbildung bei den Zellkulturen auslöst. Vielmehr zeigte sich, daß Vorliegen verschiedener Verbindungen mit unterschiedlicher Größe. Eine genauere Analyse mit Hochdruckgelpermeationschromatographie zeigte eine Größenverteilung von 10 - 30 kD für die Hauptbestandteile eines ethanolgefällten Hefeextraktes. Hieraus könnte gefolgert werden, das verschiedene Substanzen bzw. Prinzipien eine stimulierte Alkaloidproduktion bei den Zellkulturen bewirken. Ebenso könnten aber auch die verschiedenen Substanzen eine gemeinsame Komponente als eigentlich wirksames Prinzip enthalten. Ein weiteres Argument gegen einen spezifischen Effekt im Sinne der klassischen Hormonphysiologie ist auch der Umstand, das die Fähigkeit die Alkaloidproduktion zu stimulieren nicht auf die ursprünglich isolierten Pilze beschränkt ist, sondern sogar gewöhnliche Bäckerhefe, die sicher keine Pflanzenhormone enthält, die gleiche Aktivität zeigt.

Die gewonnenen Ergebnisse lassen in der Tat vermuten, daß die aktive Komponente des Hefeextraktes ein Elicitor im Sinne der Definition von KEEN (1972) ist. Seit aufkommen des Elicitorbegriffs hat es zahlreiche Versuche gegeben, solche Elicitoren, das heißt definierte chemische Verbindungen, die die Phytoalexinproduktion auslösen, aus phytopathogenen Organismen zu isolieren und zu charakterisieren. Eine gute Übersicht hierzu gibt WEST (1981). Isoliert wurden vor

allem Peptide, Zuckerpolymere und Glycoproteine. Ein von LEE et al. (1978) isolierter Elicitor aus Rhizopus stolonifer erwies sich als eine aktive Polygalakturonase. Dieses Enzym löste Polygalakturonsäuren aus der pflanzlichen Zellwand, die dann ihrerseits zur Phytoalexinbildung bei der Pflanze führten. Das gleiche System wiesen DAVIS et al. (1984) auch für die Glyceollinbildung der Sojabohne durch Isolation einer Polygalakturonase aus dem Bakterium Erwinia carotovora nach. Das Vorliegen eines aktiven Enzyms in dem von uns eingesetzten ethanolgefällten Hefeextrakt kann aber mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da die hier untersuchte Elicitoraktivität außerordentlich hitzestabil ist. Der Extrakt wird durch 60 minütiges Autoklavieren der Bäckerhefe in Citratpuffer gewonnen. Diese Prozedur sollte Enzyme denaturiert haben. Außerdem spricht die heterogene Größenverteilung elicitoraktiver Komponenten im Hefeextrakt gegen das Vorliegen eines Enzyms. In beiden zitierten Fällen sind die eigentlich aktiven Auslöser der Phytoalexinbildung aber Polymere Zuckermoleküle, nämlich die von den Enzymen produzierten Polygalakturonsäuren. In der Arbeitsgruppe von WEST gelang eine genauere Charakterisierung der aktiven Polygalakturonsäure (JIN et al. 1984). Das am besten untersuchte System chemischer Abwehr bei Pflanzen ist die Glyceollinbildung der Sojabohne nach Infektion mit dem Pilz Phytophthora megasperma. Aus diesem Pilz wurde auch der bislang am besten charakterisierte Elicitor isoliert. Es handelt sich um ein Heptaglukan. Für dieses Heptaglukan liegt eine genaue Strukturanalyse vor, die durch Synthese bestätigt wurde (SHARP et al. 1984, OSSOWSKI et al. 1984). Die von WEST (JIN et al. 1984) untersuchte Polygalakturonsäure und das Heptaglukan stellen gewärtig die einzigen, bis zur Homogenität gereinigten und strukturell eindeutig charakterisierten Elicitoren dar (siehe Abbildung 46),



Pms-Elicitor - Sharp, McNeill and Albersheim (1984)



Polygalacturonat-Elicitor - Jin and West (1984)

Abb. 46 Bislang chemisch eindeutig charakterisierte Elicitoren der Phytoalexinproduktion.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen des Elicitors gestatten eine solche Charakterisierung nicht.

Die Hitzestabilität des Elicitors schließt zwar ein aktives Enzym aus, läßt aber die Frage ob, es sich um ein polymeres Zuckermolekül, ein Peptid oder um ein Glycoprotein handelt, offen. Eine genaue Zuckeranalyse des Hefepräparates zeigte einen 25 % Anteil von Mannose, als einzige Zuckerkomponente. Die hohe Absorption des Präparates bei 280 nm und der Proteintest nach BRADFORD (1976) zeigten, daß ein Großteil der restlichen Substanzmenge wohl aus mehr

oder weniger denaturiertem Protein bzw. aus Peptiden besteht. Der Umstand allerdings, daß ein Abbau mit Proteinase K die Elicitoraktivität des Präparats kaum verändert, während durch Spaltung mit Perjodat die Elicitoraktivität vollständig verlorengeht, macht den Zuckercharakter der aktiven Komponente wahrscheinlich.

Die bei der Gelchromatographie erwiesene Heterogenität des Elicitorpräparates stellt eine Analogie zu den Arbeiten von Albersheim dar. Auch hier wurde in früheren Arbeiten eine (AYERS et al. 1976 a,b,c) Reihe verschiedener Substanzen mit Elicitoraktivität isoliert. Das am Ende strukturell charakterisierte Heptaglucan stellt nur die kleinste von ALBERSHEIM (siehe SHARP et al. 1984) isolierte Komponente mit Elicitoraktivität dar. Die strukturelle Basis des hier vorliegenden Elicitors sollten aber nicht Glucose-, sondern Mannoseeinheiten sein. Hierfür spricht nicht nur der Umstand, daß nur Mannose in unserem Elicitorpräparat nachgewiesen werden konnte, sondern auch die Ergebnisse bei gleichzeitiger Anwendung von Methylmannose und Hefeellicitor im hier verwendeten Testverfahren. AYERS et al. (1976c) berichten von einer Hemmung der Elicitoraktivität des Glucanelicitors durch gleichzeitige Gabe von Methylmannose. Im hier beschriebenen System zeigte sich eindeutig eine Steigerung des Elicitoreffektes. Letzte Gewißheit über die Verschiedenheit der hier aktiven Komponente und des Glucanelicitors lieferte der Test eines Elicitorpräparates aus Phytophthora megasperma, das uns freundlicherweise von Prof. Ebel, Freiburg, überlassen worden war. Es zeigte in unserem System keinerlei Aktivität.

Gegen das ausschließliche Vorliegen eines Elicitors auf der Basis von Mannose scheinen auf den ersten Blick die Ergebnisse der Chromatographie an DEAE-Cellulose zu sprechen. Ein Neutralzucker sollte

auf dem Ionenaustauscher nicht zurückgehalten werden. Wie im Falle des von SHARP et al. (1984) charakterisierten Heptaglacans könnte eine elicitoraktive Mannan-Komponente aber hier gebunden an andere Polymere vorliegen, zum Beispiel in Form eines Glycoproteins. Die nicht neutralen Komponenten eines solchen Moleküls würden dann eine Erklärung für die Adsorption an den Ionenaustauscher liefern.

In den meisten Fällen wurde versucht, Elicitoren aus Organismen zu isolieren, die für den jeweiligen Phytoalexinproduzenten pathogen sind. Zum Teil zeigte sich sogar eine hohe Spezifität zwischen Parasit und Wirt. Bei Experimenten mit Wurzeln von Glycine max (L.) Merr. cv Harosoy 63 zeigten HAHN et al. (1985) eine unterschiedliche Reaktion auf verschiedene Rassen des Pilzes Phytophthora megasperma. Eine Infektion der Wurzel von in diesem Fall resistenten Pflanzen mit dem nicht kompatiblen Pilz der Rasse 1 löste eine schnellere und höhere Glyceollinproduktion aus als eine Infektion der in diesem Fall suszeptiblen Pflanze mit der nicht kompatiblen Rasse 3 des Pilzes. Die Erfahrungen mit verschiedenen, rein zufällig ausgewählten Pilzen und schließlich mit der Bäckerhefe zeigten, daß eine so hohe Spezifität in unserem System nicht vorliegt. Allerdings muß bezweifelt werden, daß die beobachtete spezifische Reaktion der Sojabohne auf verschiedene Rassen des Pilzes Phytophthora megasperma ihre Ursache in einer hohen Spezifität der beteiligten Elicitoren hat. HAHN et al. (1985) untersuchten eine Infektion. Voraussetzung hierfür ist auch ein Eindringen des Pilzes nicht nur in die Zellen sondern auch in die Gewebe. Die normalerweise zur Ermittlung von Elicitoraktivität herangezogenen Systeme sind im Falle der Sojabohne aber entweder Zellkulturen oder halb zerschnittene Kotyledonen. Im letzteren Fall hat der Elicitor zum Beispiel nicht

die Schutzschicht der Cutikula zu überwinden und trifft zudem auf verletzte Zellen. In diesen Systemen entwickeln nun eine ganze Reihe von Substanzen Elicitoraktivität neben dem Glucanelicitor und den schon angesprochenen Galakturonsäuren zum Beispiel Chitosan und Poly-L-Lysin (KAUSS et al. 1986). In Albersheims Arbeitsgruppe wurde auch aus Hefe ein Glucanelicitor isoliert, der die Gyceollinbildung der Sojabohne auslöst (HAHN und ALBERSHEIM 1978). In Testsystemen, die ähnlich artifiziell sind wie die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen, zeigte also auch die Glyceollinbildung der Sojabohne keine hohe Elicitorspezifität. Tests mit den Substanzen Poly-L-Lysin, Chitosan, Nigeran, und Ribonuclease zeigten bei Zellkulturen von Eschscholtzia californica kaum eine Steigerung des Gehaltes an Benzophenanthridinalkaloiden (Kapitel III. 4.1.)). Dieses Ergebnis stimmt überein mit den Resultaten die EILERT et al. (1985) über die Stimulation der Sanguinarin Produktion bei Zellkulturen von Papaver somniferum veröffentlichten. Eine dem von uns gewonnenen Elicitorpräparat aus Hefe vergleichbare Stimulation der Benzophenanthridinproduktion ließ sich aber mit einem Skleroglucan Elicitor erzielen, der von Dr. Matern Freiburg, zur Verfügung gestellt wurde.

Auch bakterielle Zellwände wurden auf die Stimulation der Benzophenanthridinsynthese getestet. Hierbei bewirkten Zellwandpräparate der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* eine drastische Induktion der Benzophenanthridinsynthese in Stamm W von Eschscholtzia californica. Dieses Ergebnis widerspricht deutlich der von ALBERSHEIM et al. (1985) geäußerten Ansicht, Bakterienzellwände enthielten keine Zellwandkomponenten mit Elicitoraktivität. Er postuliert, die Auslösung der Phytoalexinbildung durch Bakterien beruhe immer auf der Freisetzung endogener Elicitoren aus der pflanzlichen Zellwand.

Für die hier durchgeführten Tests wurden uns hochreine bakterielle Zellwandpräparate von Prof. Fiedler, München, zur Verfügung gestellt. Sogar Zellwandpräparate, die nach tryptischem Verdau, SDS-Behandlung und Extraktion mit Formamid frei von Aminosäuren waren, zeigten eine deutliche Elicitoraktivität. Interessant ist, daß die größte Steigerung des Benzophenanthridingehaltes der Eschscholtzia-Zellkulturen mit Zellwandpräparaten von Corynebacterium diptheriae und Corynebacterium nephridii erzielt wurden, während das phytopathogene Corynebacterium fascians kaum Aktivität zeigte. Diesem Bakterium könnte gerade durch das Fehlen elicitoraktiver Komponenten in seiner Zellwand ein parasitärer Angriff auf Pflanzen in der Evolution erleichtert worden sein.

Eine Analyse des Produktspektrums der, nach Zusatz von Bakterienzellwandpräparaten zum Kulturmedium, von den Zellkulturen gebildeten Benzophenanthridine, zeigte keine Unterschiede zu dem, bei Zusatz von ethanolgefälltem Hefeelicitor festgestellten Produktspektrum. Trotzdem kann ohne weitere Analyse wohl nicht behauptet werden, die elicitoraktive Komponente der Bakterienzellwände und des Bäckerhefepräparates seien gleich. Die aktive Komponente der aminosäurefreien Bakterienzellwandpräparate ist aber sicher ein Zuckermolekül.

Zusammenfassend kann das hier isolierte Hefepräparat wohl als Elicitor angesprochen werden. Es gleicht in seinem hochmolekularen Charakter den Elicitorpräparaten, die aus anderen Systemen der Phytoalexinbildung bekannt sind. Eine Mannankomponente als das eigentlich aktive Prinzip in diesem Präparat ist zumindest sehr wahrscheinlich.

Nachdem verschiedene Substanzen auf ihre Fähigkeit getestet worden waren, in Kulturen von Eschscholtzia californica die Synthese von Benzophenanthridinen zu stimulieren, wurde auch getestet, ob das verwendete

ethanolgefällte Hefepräparat bei Zellkulturen anderer Pflanzen Veränderungen in Wuchs und Erscheinung auslöste. Bei einem Vorscreening mit Kalluskulturen bei dem farbliche Veränderungen als Kriterium für Elicitoraktivität herangezogen worden waren, wurden über 200 verschiedene Pflanzenarten aus 25 verschiedenen Familien untersucht. Deutliche farbliche Veränderungen der Kalluskulturen wurden dabei nur innerhalb der Familie der Papaveraceae beobachtet. Eine anschließende genauere Untersuchung ergab in jedem Fall einer Steigerung des Sekundärstoffgehaltes eine verstärkte Bildung von Benzophenanthridinalkaloiden. Hierbei zeigte sich aber ein von Gattung zu Gattung verschiedenes Produktspektrum. Innerhalb der Gattung Eschscholtzia waren Chelirubin und Macarpin die hauptsächlich gebildeten Alkaloide. Weder in Zellkulturen von Glaucium flavum noch in Zellkulturen von Glaucium rubrum konnte jedoch Macarpin gemessen werden. Verstärkt gebildet wurden hier die Alkaloide Sanguinarin und Chelirubin. In Corydalis ophiocarpa und Papaver somniferum wurde ausschließlich Sanguinarin gefunden. Die hier ermittelten Unterschiede im Produktspektrum können für künftige biosynthetische Untersuchungen außerordentlich nützlich sein. Die verstärkte Bildung von Sanguinarin nach Zugabe von Pilzzellwandfraktionen zum Kulturmedium wurde zuerst von EILERT et al. (1985) beschrieben. Die dort gefundenen Sanguinaringehalte sind 46 mg/l Medium. In der hier untersuchten Kultur wurden maximal 25 mg/l Medium Sanguinarin gemessen. Anzumerken ist, daß im Vorscreening von 14 untersuchten varianten Stämmen von Papaver somniferum nur zwei deutliche farbliche Veränderungen zeigten. Hieraus und auch aus den mit verschiedenen Stämmen von Eschscholtzia californica gemachten Erfahrungen (Kapitel III. 4.2) muß gefolgert werden, daß genauso wie durch Selektion Zelli-

nien mit verschieden hohem Alkaloidgehalt gewonnen werden können, auch die Reaktion varianter Stämme auf einen Elicitor variieren kann.

Die Wirkung des isolierten Hefepräparates auf Zellkulturen verschiedener Pflanzenarten aus der Familie der Papaveraceae ist damit erwiesen. In jedem Fall wird die Bildung von Benzophenanthridinalkaloiden induziert. Die induzierte Bildung von Alkaloiden bei Zugabe von Elicitoren ist in der Vergangenheit sehr selten beschrieben worden. Den ersten Bericht über vermehrte Alkaloidbildung in Zellkulturen veröffentlichten EILERT et al. (1984). Sie berichten über die Stimulation der Rutacridon-Epoxid-Bildung in Ruta graveolens durch Zugabe verschiedener Hefearten zum Kulturmedium. Der gleiche Autor berichtet 1985 von der in Zellkulturen von Papaver somniferum durch Elicitorpräparate aus Botyris spec. stimulierte Bildung von Sanguinarin. Zuletzt berichten BRODELIUS et al. (1986) von der vermehrten Bildung von Berberin in Zellkulturen. Die hier angeführten Beispiele einer vermehrten Alkaloidproduktion durch Kontakt mit Pilz-elicitoren sind alle ähnlich artifiziell wie das in dieser Arbeit beschriebene. Das einzige Beispiel für ein Alkaloid, daß der klassischen Definition eines Phytoalexins voll entspricht, ist das Avenalumin, das MAYAMA et al. (1981) aus Hafer isolierten. Um im klassischen Sinn von Phytoalexinen sprechen zu können, müßte die postinfektionelle Bildung von Benzophenanthridinalkaloiden auch bei der Ganzpflanze nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu anderen Systemen, wie beispielsweise dem der Sojabohne, sind im Falle von Eschscholtzia aber auch ohne Infektion also gewissermaßen "praeinfektionell" zumindest in der Wurzel schon wesentliche Mengen des "Phytoalexins" vorhanden. Der Versuch im Sproßbereich etiolierter Keimlinge eine postinfektionelle Benzophenanthridin-

produktion nachzuweisen, lieferte auch kein wirklich eindeutiges Ergebnis (Kapitel III. 5.1.). Zwar ließ sich eine vermehrte Alkaloidbildung im Bereich der Sproßachse nachweisen, hierzu reichte allerdings eine Verwundung völlig aus. Eine Infektion oder die Aufgabe von Pilzextrakt steigerte den Alkaloidgehalt nicht darüberhinaus. Einen ähnlichen Fall vermehrter Alkaloidbildung nach Verwundung beschreibt WINK (1983) bei Blättchen von Lupinus polyphyllus. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch daran zu erinnern, daß das nach Verwundung im Sproßbereich gemessene Produktspektrum an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden dem der Zellkultur nach Zusatz von Elicitor entspricht und nicht dem normalerweise in Pflanzen gemessenen. Chelirubin ist am höchsten konzentriert. Hierin kann eine Analogie zur elicitorstimulierten Alkaloidproduktion gesehen werden. Es könnte aber auch sein, daß sich im Zuge einer Wundreaktion hier amorphe Zellen bilden, die in ihren Eigenschaften denen von Kulturzellen ähneln. Schließlich dürfen die beiden genannten Erklärungen nicht als Gegensätze gesehen werden. Der Gedanke, daß die Pflanze zum Verschluß einer Wunde gebildete Zellen gleichzeitig mit hohen Konzentrationen antimikrobieller Substanzen ausstattet, wäre evolutionsbiologisch vernünftig. Das im Gegensatz zur Ganzpflanze veränderte Alkaloidspektrum der Zellkulturen könnte auf einem in Kulturzellen ständig abgerufenen genetischen Programm zur Wundheilung beruhen.

Über die primären Prozesse, durch die ein Elicitor den Stoffwechsel von Pflanzenzellen beeinflussen kann, ist so gut wie nichts bekannt. 1983 veröffentlichten YOSHIKAWA et al. zwar die Isolierung von Rezeptoren aus der Zellwand von Sojabohnenzellen, die Glucane aus Phytophthora megasperma spezifisch binden sollten. Eine Isolation von Rezeptoren wurde aber

seither von keiner anderen Arbeitsgruppe berichtet bzw. bestätigt. Dagegen gibt es in letzter Zeit Befunde für eine Beteiligung von Calcium-Ionen an den primären Prozeßen, die zur Phytoalexinbildung führen. Es konnte gezeigt werden, daß es bei Einwirkung von Chitosan auf Zellkulturen der Sojabohne primär zu einem Calciumeinstrom kommt. In der Folge setzt dann eine Kallose- und Phytoalexinbildung ein (KAUSS 1986). Sowohl die Kallosebildung (KAUSS 1986) als auch die durch Enzyminduktion bewirkte Glyceollinbildung (EBEL pers. Mitteilung) wird durch EDTA-Einwirkung unterdrückt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch die durch Zugabe des Hefepräparates ausgelöste Bildung der Benzophenanthridine durch Calcium-Entzug verhindert werden kann. Der Calcium-Entzug wurde durch drei Methoden erreicht. Durch Weglassen von Calcium im Medium, durch Zugabe von EDTA zum Medium und durch Zugabe von Lanthan-Ionen zum Medium. EDTA soll Calcium komplexieren; Lanthan-Ionen sollen Membrankanäle, die dem Einstrom von Calcium-Ionen dienen, blockieren. Der Umstand, daß die gleichzeitige Gabe von Elicitor und Calcium-Ionen zu Kulturen in Calcium-freiem Medium eine höhere Alkaloidbildung bewirkt als die Gabe von Elicitor allein, zeigt auch hier die Bedeutung von Calcium-Ionen und beweist darüberhinaus, daß die Kulturen durch einwöchigen Wuchs in dem Calcium-freien Medium nicht geschädigt worden sind. Eine gleichzeitige Anwendung Calcium-freien Mediums und Lanthan-Ionen-Zugabe unterdrückt die Benzophenanthridinbildung fast vollständig. Calcium spielt im hier untersuchten System also wohl die gleiche Rolle wie bei der elicitorinduzierten Glyceollinproduktion von Sojabohnen-Zellkulturen.

Aus *Pertersilie*-Zellkulturen ist bekannt, daß Pilz- Elicitoren nicht nur die Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) Aktivität induzieren,

sondern gleichzeitig zu einer erhöhten Ethylenbildung führen. Gemessen wurden nach Gabe von Elicitoren auch erhöhte Gehalte an ACC und eine Induktion der ACC-Synthase- und Chitinase-Aktivität (CHAPPELL et al. 1984). Weiter wurde beobachtet, daß ein spezifischer Hemmstoff der ACC-Synthase die Induktion der PAL-Aktivität hemmt. Künstlicher Zusatz von ACC rekonstituiert die Induzierbarkeit der PAL durch Pilz-elicitoren. Messungen des ACC- Gehaltes und des Gehaltes an Malonyl-ACC, einer Speicherform des ACC, in Kulturen von Eschscholtzia californica nach Elicitor-zusatz zeigten ebenfalls eine Zunahme. Hierbei fiel die Steigerung des ACC-Gehaltes (2.5 fach) geringer aus, als die Steigerung des Gehaltes an Malonyl-ACC (3 fach). Insgesamt waren die in den Zellkulturen gemessenen ACC Werte aber um den Faktor 10 kleiner als die von CHAPPELL et al. (1984) gemessenen. Weder in normalen noch in mit Elicitor versetzten Zellkulturen von Eschscholtzia californica konnte eine ACC-Synthase- Aktivität nachgewiesen werden. Allein daraus den Schluß zu ziehen, eine Induktion der ACC-Synthase finde nicht statt, ist allerdings problematisch, weil der Nachweis dieses Enzyms in Zellkulturen nur in seltenen Ausnahmefällen gelingt (AMRHEIN, pers. Mitteilung). Ganz eindeutig ließ sich aber feststellen, daß eine erhöhte Ethylenbildung nach Elicitorzusatz zum Kulturmedium nicht erfolgt. Dieser Befund ist um so wichtiger, als sich ebenfalls zeigen läßt, daß ein künstlicher Zusatz von ACC sofort zu einer starken Bildung von Ethylen durch die Zellkulturen führt. Die nach künstlichem ACC-Zusatz gemessene Ethylenproduktion ist in unbehandelten Zellkulturen genauso hoch wie in elicitorbehandelten. Dies zeigt deutlich, daß die Bildung von ACC in diesem Fall limitierend für die Ethylenproduktion ist und nicht die späteren biosynthetischen Schritte. Daß

trotz einer leichten Steigerung des ACC-Gehaltes keine Ethylenbildung beobachtet wird, muß auf die absolut sehr geringen ACC- Werte und auf die bevorzugte Bildung von Malonyl-ACC zurückgeführt werden. Ausschließen kann man aufgrund der hier gemachten Ergebnisse aber, daß das Pflanzenhormon Ethylen als "second messenger" eines Pilzelicitors fungiert. Eine Induktion einer ACC-Synthase-Aktivität kann nicht sicher ausgeschlossen werden.

Im Falle der durch Elicitoren aus Phytophthora megasperma induzierten Bildung von Furanocoumarinen und Flavonoiden bei Petersilien Zellkulturen ist nicht nur die Induktion von Enzymaktivitäten beschrieben. Durch Hybridisierungsexperimente mit cDNA konnte nachgewiesen werden, daß im Falle der Enzyme Phenylalanin-Ammonium-Lyase, 4-Coumarat:CoA-Ligase und Chalcone-Synthase ein Anstieg der entsprechenden mRNAs für diese Enzyme stattfindet (CHAPPELL und HAHLBROCK 1984). Der Nachweis der de novo Synthese solcher an der Phytoalexinbildung beteiligter Enzyme gelang auch bei Zellkulturen von Glycine max (EBEL et al. 1984) und Phaseolus vulgaris (RYDER et al. 1984). Die induzierte Phytoalexinbildung durch de novo Synthese der beteiligten Enzyme wurde damit zu einem allgemeinen Postulat. Solche Untersuchungen waren möglich, weil die beteiligten Enzyme seit langem bekannt und gut untersucht sind. In allen angeführten Fällen gehören die Enzyme aber zur Biosynthese strukturell nahe verwandter Sekundärstoffe. Ähnliche Untersuchungen zur induzierten Bildung von Alkaloiden liegen bislang nicht vor. Ebenfalls noch nicht auf enzymatischem Niveau untersucht ist die Biosynthese der Benzophenanthridine. Fütterungsexperimente zeigen, daß die Protoberberine Stylopin, Scoulerin und Tetrahydroberberin, sowie deren Vorstufe Retikulin in die Benzophenanthridinalkaloide eingebaut werden.

Dies bot die Möglichkeit, die am Institut zur Aufklärung der Biosynthese des Berberins entwickelten Enzymtests einzusetzen.

Die Enzyme Norlaudanosolin-Synthase und (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase konnten im untersuchten Gewebe nicht nachgewiesen werden. Dies war im Fall der Norlaudanosolin-Synthase ungewöhnlich, weil die von diesem Enzym katalysierte Reaktion auch für die Biosynthese der Benzophenanthridine von Bedeutung sein sollte. Anders verhält es sich mit dem Enzym (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Tetrahydroprotoberberinen. Die Endprodukte der weiteren Biosynthese sind dann Protoberberine wie Berberin und Jatrorrhizin (ZENK 1985). Ein wichtiges Charakteristikum der Substratspezifität gerade dieses Enzyms ist, daß es das Alkaloid Tetrahydroberberin sehr gut, nicht aber N-Methyltetrahydroberberin umsetzt (AMANN 1986). Beide Substanzen sind aber durch Fütterungsexperimente als Vorstufen der Benzophenanthridine nachgewiesen worden (TAKAO et al. 1983). Das Alkaloid Tetrahydroberberin könnte somit an einem Verzweigungspunkt der Biosynthese stehen (RÜFFER und ZENK 1986). Von hier aus könnte die Oxidation durch die (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase weiter führen zu den Protoberberinen, während die N-Methylierung des Canadins die Synthesekette zu den Benzophenanthridinen einleitet. Das Fehlen einer (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase-Aktivität wäre demnach folgerichtig. Die geforderte Tetrahydroberberin- N-Methyltransferase-Aktivität läßt sich in der untersuchten Kultur nachweisen. Neben diesem Enzym konnten noch eine Norretikulin-N-Methyltransferase und das Berberin-Brücken-Enzym nachgewiesen werden. Für den möglicherweise letzten Biosyntheseschritt zu den Benzophenanthridinen, nämlich die Oxidation der Dihydroformen, wurde ein neues Enzymtestverfahren analog dem Testverfahren für die (S)-

Tetrahydroprotoberberin-Oxidase entwickelt. Obwohl TAKAO et al. (1983) aufgrund von Fütterungsexperimenten die Umwandlung von Dihydrobenzophenthridinen in ihre oxidierten Formen bestreiten, konnte ohne große Schwierigkeiten eine solche Aktivität gefunden werden.

Bei allen Enzymen, die in der Zellkultur nachgewiesen werden konnten, konnte auch eine Steigerung der Enzymaktivität im Rohextrakt nach Zugabe des Hefeelictors zum Kulturmedium nachgewiesen werden. Hierbei ist die Messung der Enzyme im Rohextrakt nicht unproblematisch. Die Aktivität des Berberin-Brücken-Enzyms wird zum Beispiel im Rohextrakt gehemmt (STEFFENS 1984). Es ist also möglich, daß im Rohextrakt gemessene Enzymaktivitäten zu niedrig bestimmt werden. Solche Hemmeffekte könnten sich vor allem auswirken, wenn die induziert gebildeten Benzophenanthridinalkaloide eine Hemmung der Enzymaktivität bewirken. Die eindeutige Messung einer Zunahme der Enzymaktivitäten zeigt aber, daß das hier gewählte Meßverfahren anwendbar ist. Der Umstand, daß die Zugabe des Elicitors in der logarithmischen Wachstumsphase die größte Steigerung der Enzymaktivitäten bewirkt (Kapitel III. 5.4.3.), stimmt mit der Beobachtung überein, daß der in dieser Wachstumsphase der Kultur zugegebene Elicitor ebenfalls die höchste Steigerung im Benzophenanthridingehalt zur Folge hat. Bis auf die Tetrahydroberberin-N-Methyltransferase-Aktivität steigen alle gemessenen Enzymaktivitäten in der stationären Wachstumsphase der Zellkultur auch ohne Elicitorzugabe stark an. Dies war für das Berberin-Brücken-Enzym von STEFFENS (1984) bei Kulturen von Berberis beaniana Schneid. ebenfalls beobachtet worden. Eine Steigerung der Enzymaktivitäten am Ende der Wachstumsphase durch Elicitorzugabe zum Medium ist bei allen Enzymen nicht mehr zu erreichen. Da die Kulturen in dieser Phase ihr Wachstum einstellen und die

Zellen zum Teil absterben, könnte der Anstieg der Enzymaktivitäten in dieser Wuchsphase auch auf der Freisetzung endogener Elicitoren beruhen.

Im folgenden wurde der zeitliche Verlauf des Anstiegs der Enzymaktivitäten unmittelbar nach Elicitorzusatz genauer verfolgt. Hierbei konnte ein Anstieg der Enzymaktivitäten frühestens nach 12 Stunden beobachtet werden. Verglichen mit der Enzyminduktion bei *Petersilie*-Zellkulturen zeigte sich hier eine langsamere Reaktion. Im Falle der Tetrahydroberberin-N-Methyltransferase erfolgte eine Aktivitätszunahme erst 16 Stunden nach Elicitorzugabe. Bis auf die Norretikulin-N-Methyltransferase-Aktivität fielen die Enzymaktivitäten bei den mit Elicitor versetzten Kulturen nach Durchlaufen eines Maximums wieder ab. Das Maximum der Enzymaktivität war beim Berberin-Brücken-Enzym und bei der Dihydromacarpin-Oxidase 16 Stunden nach Elicitorzugabe erreicht, bei der Tetrahydroberberin-N-Methyltransferase erst nach 24 Stunden. Eine Erklärung für das Absinken der Enzymaktivität kann nicht gegeben werden. Das gleiche Phänomen zeigte sich allerdings auch bei den Enzymen des Flavonoidstoffwechsels bei *Petersilie* Zellkulturen (CHAPPELL und HAHLBROCK 1984). Eine gleichzeitige Messung der Zunahme der oxidierten Benzophenanthridinalkaloide zeigte, daß 24 Stunden nach Elicitorzugabe zum ersten Mal ein deutlich höherer Alkaloidgehalt gemessen wurde. Hierbei stieg zunächst die Konzentration an Chelirubin an. Erst später erfolgte auch eine Zunahme des Sanguinarin- und Chelerythrin-gehaltes (nach 36 Stunden) bzw. eine deutliche Zunahme des Macarpingehaltes (nach 48 Stunden). Eine Erklärung dieses Umstandes kann nur aus einer genaueren Kenntnis der Biosynthese erfolgen. Vor allem wäre hierfür wichtig zu wissen, auf welcher biosynthetischen Stufe die Hydroxylierung der Positionen 5 und 12 erfolgt.

Legt man die Höhe der gemessenen Aktivitätssteigerungen nach Elicitorzugabe zugrunde, muß das Berberin-Brücken-Enzym als Schlüsselenzym der induzierten Alkaloidbildung angesehen werden. Seine Aktivität wird um das zehnfache gesteigert. Daneben zeigt auch die Tetrahydroberberin-N-Methyltransferase eine deutliche Aktivitätszunahme (6 fach). Eine nur geringe Steigerung zeigte die Dihydromacarpin-Oxidase (2 fach).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Induktion der Benzophenanthridinbildung durch das Hefeelictorpräparat schon bei frühen Biosyntheseschritten einsetzt. Aufgrund der hier durchgeführten Messungen kann aber nicht entschieden werden, ob wirklich eine de novo Synthese der genannten Enzyme stattfindet. Die Zunahme der Enzymaktivitäten könnte ebenso gut auf einer Aktivierung der Enzyme, zum Beispiel durch chemische Modifikation, beruhen.

TAKAO et al. (1983) hatten bei Fütterung von radioaktiv markiertem Dihydrosanguinarin an Zellkulturen von Macleaya cordata keinen Einbau der Radioaktivität in Chelirubin messen können. Sie folgerten daraus, die, für die Bildung von Chelirubin und Macarpin notwendigen Hydroxylierungen fänden auf der Stufe der oxidierten Benzophenanthridinalkaloide statt. Dies steht im Gegensatz zu der hier beschriebenen Oxidase-Aktivität, die mit Dihydromacarpin als Substrat gemessen wurde. Um die Möglichkeit, daß hierbei eine unspezifische Oxidase-Aktivität gemessen wurde, ausschließen zu können, war eine Reinigung und Charakterisierung der Oxidase notwendig. Hierzu wurden konventionelle Mittel eingesetzt. Ein wesentliches Argument gegen das Vorliegen von unspezifischen Oxidasen ergibt sich aus der Induzierbarkeit der gemessenen Oxidaseaktivität. Ein weiteres Argument liefert das Reinigungssystem. In den verschiedenen

Reinigungsschritten wurde keine Aufteilung der Enzymaktivität in verschiedene Fraktionen beobachtet.

Mit den beschriebenen Methoden wurde eine 70 fache Anreicherung erreicht. Ein solcher Anreicherungsfaktor allein reicht sicher nicht, um ein homogenes Enzympräparat zu erzielen. Als ungünstig muß angesehen werden, daß es nicht gelang aktives Enzym aus Elektrophoresegelen zu eluieren. Damit konnte der Enzymaktivität keine Proteinbande bei der Elektrophorese zugeordnet werden. Eine Reinheitsüberprüfung war damit nicht möglich. Die Daten zur Substratspezifität liefern aber dennoch einen eindeutigen Beweis für das Vorliegen eines spezifischen Enzyms. Dies ist der Umstand, daß mit Dihydrochelerythrin in der gereinigten Fraktion keine Enzymaktivität gemessen werden konnte. Die bei der Charakterisierung des Enzyms gemessenen Werte wie pH-Optimum der Reaktion, Temperaturoptimum der Reaktion, Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt sind nicht ungewöhnlich und müssen daher nicht besonders diskutiert werden. Die angegebenen K_m -Werte sind angesichts eines nicht bis zur Homogenität gereinigten Enzympräparates anfechtbar. Werte für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für die untersuchten Substrate wurden daher nicht angegeben. Die Größenordnung der ermittelten K_m -Werte (5 - 16 $\mu\text{mol/l}$) ist ebenfalls nicht ungewöhnlich. Die (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase hat zum Vergleich für das Substrat Canadin einen K_m -Wert von 13.3 $\mu\text{mol/l}$ (AMANN 1986). Der für das Substrat (S)-Retikulin gemessene K_m -Wert des Berberin-Brücken-Enzyms aus Berberis beaniana Schneid. ist allerdings mit 0.14 $\mu\text{mol/l}$ um eine ganze Zehnerpotenz kleiner (STEFFENS 1984).

Als Cosubstrat für das beschriebene Enzym wurde Sauerstoff festgestellt. Allerdings konnte keine exakte Stöchiometrie der Reaktion ermittelt werden. Vor allem blieb unklar, ob H_2O oder H_2O_2 das zweite

Reaktionsprodukt war.

Aus den Hemmstofftests wird deutlich, daß Flavin als mögliches Coenzym in Betracht kommt. Nur die Flavin-Hemmstoffe Morin und Dicoumarol zeigten eine nennenswerte Hemmung des Enzyms, während N-Ethylmaleinimid, ein SH-Gruppen modifizierendes Reagenz, keine Hemmwirkung zeigte. Der stark erhöhte Umsatz nach Zusatz von Kupferionen zum Enzymtest deutet auf das Vorhandensein von Kupfer im aktiven Zentrum hin. Nach den Ergebnissen der Hemmstofftests ist am ehesten mit einem Kupfer- und Flavin-haltigen aktiven Zentrum zu rechnen.

Die beschriebene Enzymcharakterisierung untermauerte die Ansicht, daß hier eine Dihydrobenzophenanthridin-spezifische Oxidase-Aktivität gefunden worden war. Eine Erklärung für die Diskrepanz zu den Ergebnissen der von TAKAO et al. (1983) beschriebenen Fütterungsexperimenten lieferten die enzymatischen Arbeiten jedoch nicht. Eine mögliche Erklärung wäre die Kompartimentierung des Oxidationsschrittes. Das von TAKAO et al. (1983) zugefütterte Dihydrosanguinarin hätte unter Umständen nicht ins Innere der Kompartimente gelangen können. Gerade eine Kompartimentierung der Oxidase-Aktivität konnte aber nicht festgestellt werden. Die geringen Unterschiede in der Substratspezifität zwischen Dihydrosanguinarin, Dihydrochelirubin und Dihydromacarpin hätten in unserem System in jedem Fall eine Oxidation von methoxyliertem Dihydrosanguinarin ermöglicht.

Streng genommen folgt natürlich aus dem Nachweis von Enzymaktivitäten, die bei der Biosynthese der Protoberberine wirksam sind, nicht, daß bei der Biosynthese der Benzophenanthridine die gleichen Enzyme beteiligt sind. Es besagt lediglich, daß die Katalyse gleicher Reaktionsschritte mit den gleichen Enzymtestverfahren nachgewiesen werden kann. Trotzdem sind Ähnlichkeiten wahrscheinlich. Für die Biosynthese der

Protoberberine wurde an diesem Institut erstmals die Kompartimentierung bestimmter Syntheseschritte in speziellen Vesikeln beschrieben (AMANN et al. 1986). Zu den vesikulär kompartimentierten Enzymen gehört auch das Berberin-Brücken-Enzym. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch in Zellen von Eschscholtzia californica eine Kompartimentierung dieses Reaktionsschrittes vorliegt. Auch hier wird nach einem Zellaufschluß, der vesikuläre Strukturen nicht zerstört, die Berberin-Brücken-Enzym-Aktivität nach Ultrazentrifugation nicht im Überstand eines Saccharose-Dichtegradienten gefunden, sondern bei der Dichte, die AMANN et al. (1986) für die vesikulären Strukturen beschrieben hatten. Der Umstand, daß die Dihydromacarpin-Oxidase nicht kompartimentiert ist, beweist aber, daß Zwischenprodukte der Benzophenanthridinbiosynthese diese Vesikel wieder verlassen müssen. Daß Dihydromacarpin Oxidase und Berberin-Brücken-Enzym in verschiedenen Zellkompartimenten wirksam sind, zeigen auch die stark voneinander abweichenden pH-Optima. Im Falle der Protoberberine transportieren die beschriebenen Vesikel die Endprodukte der Biosynthese durch Fusion mit dem Tonoplasten in die Vakuole.

Strukturelle und ultrastrukturelle Untersuchungen von Zellkulturzellen nach Elicitoreinwirkung zum Verbleib der Benzophenanthridinalkaloide lieferten verblüffende Ergebnisse. In einer Vielzahl von Beispielen wird eine Einlagerung von Sekundärstoffen in die Zellvakuole beschrieben. Gerade bei der stimulierten Produktion großer Sekundärstoffmengen, die mit großer Wahrscheinlichkeit auch für die Pflanzenzelle toxisch sind, mußte man eine Einlagerung in die Vakuole erwarten. Für nahe Verwandte von Eschscholtzia ist die Einlagerung in die Vakuole gut dokumentiert. LANG und KOHLENBACH (1982) beobachteten bei Protoplasten von Macleaya cordata gelb-braune Tröpf-

chen, die mit der Vakuole verschmolzen. Auch EILERT et al. (1985) sprechen von einer Fluoreszenz der Vakuole bei Zellen von Papaver somniferum die durch Pilzelicitor zur Sanguinarin-Produktion angeregt worden sind. Bei der ultrastrukturellen Untersuchung solcher alkaloidproduzierender Zellen wird von verschiedenen Autoren das häufige Auftreten elektronendichter Punkte in unmittelbarer Nähe des Protoplasten beschrieben (KUTCHAN et al. 1983, EILERT et al. 1985, AMANN et al. 1986).

Bei den hier untersuchten Kulturen verbleiben die stark fluoreszierenden Substanzen aber eindeutig im Cytoplasma. Die im Dichtegradienten gefundenen, roten Banden zeigen das Vorhandensein subzellulärer, alkaloidhaltiger Strukturen mit definierter Dichte. Eine ultrastrukturelle Analyse zeigte aber lediglich eine Fraktion aus rauhem endoplasmatischem Retikulum. Die bei dieser Dichte konzentrierten Alkaloide können demnach nur an die Ribosomen gebunden oder in endoplasmatischen Vesikeln vorkommen. Ebenfalls verblüffend ist die stark rote Fluoreszenz der Kernbereiche und die gleichmäßige Verteilung der blau fluoreszenten Partikel über das gesamte Cytoplasma. Da die Oxidase erwiesenermaßen nicht kompartmentiert ist, erklärt meiner Ansicht nach die Annahme, daß die oxidierten Benzophenanthridine mit Sekundärstrukturen in der rRNA bzw. der DNA im Kernbereich interkalieren, die Beobachtungen am besten. Für das quaternäre Alkaloid Berberin wurde Interkalation mit DNA beschrieben (HAHN et al. 1971). Im letzten Biosyntheseschritt, nämlich der Oxidation, erhalten die Benzophenanthridine gleich zwei, für die Interkalation mit DNA wichtige Eigenschaften, nämlich einmal die positive Ladung und zum anderen die vollkommen planare Struktur. Die so entstandenen Interkalationssubstanzen könnten jetzt passiv in den Zellkern und in Ribosomen eingelagert werden. Das Interkalations-

verhalten würde darüberhinaus die antimikrobiellen Eigenschaften und damit die Eignung der Benzophenanthridine als Phytoalexine erklären. Diese Erklärung wirft aber die hochinteressante Frage auf, wie die Pflanzenzelle selbst die Einlagerung der Substanzen in ihre rRNA und DNA überlebt.

Abschließend muß noch auf das in der Einleitung bereits angesprochene Oligosaccharin-Konzept Peter Albersheims eingegangen werden (ALBERSHEIM 1985). Albersheim gelang es, durch Zugabe von Polymerzuckern Differenzierungen bei Tabakexplantaten auszulösen. Er vermutet, in Zuckerbestandteilen der pflanzlichen Zellwand die eigentlichen, die Morphogenese steuernden Pflanzenhormone gefunden zu haben. Entsprechend könnte es sich auch im hier beobachteten Fall der stimulierten Benzophenanthridinproduktion nicht nur um eine pflanzliche Abwehrreaktion handeln, sondern auch um eine hormonell gesteuerte Differenzierung. Die am Anfang dieser Arbeit zugrundegelegte Arbeitshypothese, die Pilzinfektion überführe gewissermaßen die Zellen des weißen Stammes W in den physiologischen Zustand des roten Stammes TR, hätte sich auf dieser Basis erklären lassen. Gegen eine derartige Annahme spricht aber der Befund, daß sich in allen Teilen differenzierter Pflanzen ein völlig anderes Produktspektrum der Benzophenanthridine feststellen läßt als in den Zellkulturen. Lediglich die verletzten Sproßstücke zeigen eine den Zellkulturen vergleichbare Produktverteilung.

Obwohl auch Zweifel daran bleiben, ob das hier beschriebene System in allen Punkten der klassischen Vorstellung von Phytoalexinbildung entspricht, so erklärt die Annahme einer induzierten Abwehr von Schadorganismen die gemachten Befunde sicher am besten.

V. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Induktion der Bildung von von Benzophenanthridinalkaloiden durch variante Stämme von Zellsuspensions-Kulturen der Pflanze Eschscholtzia californica nach Infektion mit Pilzen nachgewiesen und näher untersucht. Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Es wurden konventionelle- und HPLC-Methoden zum Nachweis von Alkaloiden in Zellkulturen und differenzierten Pflanzen von Eschscholtzia californica entwickelt. Mit Hilfe dieser Methoden wurde der Alkaloidgehalt varianter Zellkulturstämme und ganzer Pflanzen von Eschscholtzia californica bestimmt und verglichen.
2. Aufbauend auf die bisherigen Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, daß farbliche Veränderungen der Zellkulturen nach Infektion mit Pilzen oder Kontakt mit autoklaviertem Pilzmycel auf einer Zunahme des Gehaltes an oxidierten Benzophenanthridinalkaloiden beruhen.
Aus Bäckerhefe wurde ein Gemisch hitzestabiler Substanzen gewonnen die die Alkaloidsynthese der Zellkulturen stimulieren. Die Größenverteilung war 10 - 30 kD. Aktive Komponente ist vermutlich ein Mannose-Polymer. Das Hefepräparat hat große Ähnlichkeit mit Elicitorpräparaten, die aus phytopathogenen Pilzen gewonnen wurden und in Pflanzen die Bildung von Phytoalexinen auslösen.
3. Bakterienzellwandpräparate konnten die Alkaloidsynthese der Zellkulturen ebenfalls stimulieren

4. Bei Kalluskulturen von 190 Pflanzenarten aus 25 verschiedenen Familien konnte nur innerhalb der Familie der Papaveraceae eine Farbveränderung nach Einwirkung des Hefeelicitators festgestellt werden. Eine genaue Analyse zeigte eine stimulierte Benzophenanthridinsynthese innerhalb der Gattung Eschscholtzia bei 7 Arten, außerdem bei Zellkulturen der Pflanzen Chelidonium majus, Glaucium rubrum, Glaucium flavum, Papaver somniferum und Corydalis ophiocarpa. Der Elicitor ist offensichtlich Verbindungsspezifisch
5. Es konnte gezeigt werden, daß bei Verwundung im Sproßbereich etiolierter Keimlinge von Eschscholtzia californica ebenfalls eine erhöhte Bildung von Benzophenanthridinen stattfindet. Das dabei gebildete Produktspektrum entspricht dem nach Elicitor-einwirkung bei den Zellkulturen beobachteten.
6. Durch Calciumentzug mit EDTA und Blockierung von Calciumkanälen durch Zusatz von Lanthanchlorid zum Medium wurde bewiesen, daß Calciumionen eine Rolle bei der Auslösung der Alkaloidbildung in den untersuchten Zellkulturen spielen. Dies gilt auch für andere Beispiele der Phytoalexinbildung (KAUSS 1986).
7. Eine erhöhte Ethylenbildung durch die Zellkulturen von Eschscholtzia nach Elicitoreinwirkung, wie sie bei Zellkulturen von *Petersilie* beschrieben ist (CHAPPELL et al. 1984), kann hier nicht gemessen werden. Leicht erhöhte Gehalte an ACC- und Malonyl-ACC nach Elicitorzusatz wurden gemessen.
8. Es konnte nachgewiesen werden, daß der Elicitor bei Zellkulturen von Eschscholtzia californica (Stamm W) eine Steigerung der im Rohextrakt gemes-

senen Aktivitäten folgender an der Biosynthese der Benzophenanthridine beteiligter Enzyme bewirkt: (S)-Adenosylmethionin:(R,S)-Norretikulin-N-Methyltransferase, Berberin-Brücken-Enzym, (S)-Adenosylmethionin:Tetrahydroberberin-N-Methyltransferase und Dihydromacarpin-Oxidase.

Es wurde festgestellt, daß die Elicitorzugabe in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellkultur die höchste Steigerung der Enzymaktivitäten auslöst.

Die Aktivitätszunahme erfolgte frühestens zwischen 8 und 12 Stunden nach Elicitorzusatz (beim Berberin-Brücken-Enzym). Nach Erreichen eines Aktivitätsmaximums 16 - 20 Stunden nach Elicitorzugabe sanken die gemessenen Enzymaktivitäten wieder ab.

Die stärkste Aktivitätszunahme nach Elicitoreinwirkung wurde beim Berberin-Brücken-Enzym gemessen.

9. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Enzym, das an der Biosynthese der Benzophenanthridinalkaloide beteiligt ist entdeckt.

Das erarbeitete Reinigungsschema für das Enzym bestand aus einer fraktionierten Ammoniumfällung, Gelchromatographie, Chromatographie an DEAE-Sephadex, Chromatographie an CM-Cellulose und FPLC an dem Material Mono-Q. Mit diesem Reinigungssystem wurde eine 70 fache Anreicherung der Enzymaktivität bei 3 % Aktivitätsausbeute erreicht.

Das partiell gereinigte Enzym wurde charakterisiert. Die ermittelten Daten waren: Temperaturoptimum: 45° C; pH-Optimum: pH 7.5; Molekulargewicht: 56 kD; IEP: pH 8.8. Das Enzym setzte die Substrate Dihydrosanguinarin, -chelirubin und -macarpin um. Dihydrochelerythrin wurde nicht umgesetzt. Die höchste Affinität zeigte das Enzym gegenüber Dihydromacarpin ($K_m = 5.6 \mu M$). Als Co-

substrat der Reaktion wurde O_2 nachgewiesen. Hemmstofftests deuten die Anwesenheit von Kupferionen und Flavin im aktiven Zentrum an.

Die Existenz dieses Enzyms beweist die Ansicht, daß Dihydrobenzophenanthridine die biosynthetischen Vorstufen der oxidierten Formen sind zumindest für dieses System.

10. Im Rahmen struktureller Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das Berberin-Brücken-Enzym in der Zelle in vesikulären Strukturen kompartimentiert ist. Die beschriebene Dihydromacarpin-Oxidase liegt jedoch nicht kompartimentiert vor. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte nachgewiesen werden, daß die gebildeten Benzophenanthridinalkaloide im Cytoplasma vorliegen. Hier sind Dihydrobenzophenanthridine gleichmäßig verteilt und die oxidierten Formen im Bereich des Kerns konzentriert. Mit den Methoden der Ultrazentrifugation und der Elektronenmikroskopie wurde nachgewiesen, daß die oxidierten Benzophenanthridine im rauen endoplasmatischen Retikulum konzentriert vorkommen.

VI. Literaturverzeichnis

- ALBERSHEIM, P., DARVILL, A.G.: Oligosaccharine:
Zucker als Pflanzenhormone. Spekt. der Wissenschaft
(11/1985) 86-93.
- AMANN, M.: Untersuchungen zur Konfigurationsumkehr
in der Morphinbiosynthese. Diplomarbeit, Ludwig-
Maximilians-Universität München (1982).
- AMANN, M., WANNER, G., ZENK, M.H.: Intracellular
Compartmentation of Two Enzymes of Berberine Bio-
synthesis in Plant Cell Cultures. Planta 167
(1986) 310-320.
- AMANN, M.: (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase - Das
zentrale Enzym in der Oxidation von Benzyliso-
chinolin Alkaloiden. Dissertation, Ludwig-Maximi-
lians-Universität München (1986).
- ANDERSON, L.A., PHILLIPSON, J.D., KEENE, A.T.:
Alkaloid Production by Leaf, Root Organ and Cell
Suspension Cultures of Cinchona ledgeriana.
Planta Med. 46 (1982) 25-27.
- ARENS, H., BORBE, H.O., ULBRICH, B., STÖCKIGT, J.:
Detection of Pericine, a New CNS-active Indole Alka-
loid from Picralima nitida Cell Suspension Cul-
ture by Opiate Receptor Binding Studies. Planta Med.
46 (1982) 210-214.
- AYERS, A.R., EBEL, J., FINELLI, F., BERGER, N.,
ALBERSHEIM, P.: Host-Pathogen Interactions IX.
Quantitative Assays of Elicitor Activity and
Characterization of the Elicitor Present in the
Extracellular Medium of Cultures of Phytophthora
megasperma var. sojae. Plant Physiol. 57
(1976a) 751-759.
- AYERS, A.R., EBEL, J., VALENT, B., ALBERSHEIM, P.:
Host-Pathogen Interactions X. Fractionation and
Biological Activity of an Elicitor Isolated from
Mycelial Walls of Phytophthora megasperma var.
sojae. Plant Physiol. 57 (1976b) 760-765.

- AYERS, A.R., VALENT, B., EBEL, J., ALBERSHEIM, P.: Host-Pathogen Interactions. XI. Composition and Structure of Wall-Released Elicitor Fractions. *Plant Physiol.* 57 (1976c) 766-774.
- BATTERSBY, A.R., FRANCIS, R.J., RUVEDA, E.A., STAUNTON, J.: Biosynthesis of Chelidonine and Stylopine. *Chem. Commun.* 5 (1965) 89-91.
- BATTERSBY, A.R., FRANCIS, R.J., HIRST, M., SOUTHGATE, R., STAUNTON, J.: Stereochemical Studies Concerning the Biosynthesis of Narcotine, Protopine and Chelidonine. *Chem. Commun.* 12 (1967) 602-604.
- BAUER, W.D., TALMADGE, K.W., KEEGSTRA, K., ALBERSHEIM, P.: The Structure of Plant Cell Walls. II. The Hemicellulose of the Walls of Suspension-Cultured Scyamore Cells. *Plant Physiol.* 51 (1973) 174-187.
- BECKER, H.: Untersuchungen zur Frage der Bildung flüchtiger Stoffwechselprodukte in Calluskulturen. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 71 (1970) 425-441.
- BENSADOUN, A., WEINSTEIN, D.: Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. *Anal. Biochemistry* 70 (1976) 241-250.
- BERLIN, J., FORCHE, E., WRAY, V., HAMMER, J., HÖSEL, W.: Formation of Benzophenanthridine Alkaloids by Suspension Cultures of *Eschscholtzia californica*. *Z. Naturforsch.* 38c (1983) 346-352.
- BRADFORD, M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgramm Quantities of Protein Using the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochemistry* 72 (1976) 248-254.
- BREIDENBACH, R.M., BEEVERS, H.: Association of the Glyoxalate Cycle Enzymes in a Novel Subcellular Particle from Castor Bean Endosperm. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 27 (1967) 462-469.
- BRIDGES, M.A., KLARMAN, W.L.: Soybean Phytoalexin Hydroxylphaseollin Induced by Ultraviolet Irradiation. *Phytopathology* 63 (1973) 606-609.

- BRODELIUS, P., GUEGLER, K., FUNK, C.: Induction of Secondary Metabolism in Cell Suspension Cultures after Treatment with a Yeast Glucan Preparation. In: VI. Int. Congr. of Plant Tissue and Cell Cult. Abst.. Somers, D.A., Gengenbach, B.G., Biesboer, D.D., Hackett, W.P., Green, C.E. (eds.) Minnesota 1986.
- BROOKS, C.J.W., WATSON, D.G.: Phytoalexins. Nat. Prod. Reports 2 (1985) 427-461.
- BRUCE, R.J., WEST, C.A.: Elicitation of Casbene Synthase Activity in Castor Bean. Plant Physiol. 69 (1982) 1181-1188.
- CAREW, D.P., STABA, E.J.: Plant Tissue Culture: Its Fundamentals, Application and Relationship to Medicinal Plant Studies. Lloydia 28 (1965) 1-26.
- CHAPPELL, J., HAHLBROCK, K., BOLLER, T.: Rapid Induction of Ethylene Biosynthesis in Cultured Parsley Cells by Fungal Elicitor and its Relationship to the Induction of Phenylalanine Ammonia-lyase. Planta 161 (1984) 475-480.
- CHAPPELL, J., HAHLBROCK, K.: Transcription of Plant Defence Genes in Response to UV-light or Fungal Elicitor. Nature 311 (1984) 76-78.
- CRAMER, C.L., RYDER, T.B., BELL, J.N., LAMB, C.J. Rapid Switching of Plant Gene Expression Induced by Fungal Elicitor. Science 227 (1984) 1240-1243.
- CRUICKSHANK, I.A.M., PERRIN, A.M., DAWN, R.: The Isolation and Partial Purification of Molinocolin A, A Polypeptide Inducing Activity from Monilinia fructicola (Sclerotinia fructicola). Life Sci. 10 (1968) 449-458.
- CZYGAN, F.C.: Möglichkeiten zur Produktion von Arzneistoffen durch pflanzliche Gewebekulturen. Planta Med. Suppl. (1975) 169-185.
- DAVIS, K.R., LYON, G.D., DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P.: Host-Pathogen Interactions. XXV. Polygalacturonic Acid Lyase From Erwinia carotovora Elicits Phytoalexin Accumulation By Releasing Plant Cell Wall Fragments. Plant Physiol. 74 (1984) 52-60.

- DAVIS, K.R., DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P.: Host-Pathogen Interactions XXXI. Several Biotic and Abiotic Elicitors act Synergistically in the Induction of Phytoalexin Accumulation in Soybean. *Plant. Mol. Biol.* 6 (1986) 23-32.
- DARVILL, A.D., McNEIL, M., ALBERSHEIM, P.: Structure of Plant Cell Walls. VIII. A New Pectic Polysaccharide. *Plant Physiol.* 62 (1978) 418-422.
- DE WIT, P.J.G.M., HOFMAN, A.E., VELTHUIS, G.C.M., KUC, J.A.: Isolation and Characterization of an Elicitor of Necrosis Isolated from Intercellular Fluids of Compatible Interactions of *Cladosporium fulvum* (Syn. *Fulvia fulva*) and Tomato. *Plant Physiol.* 77 (1985) 642-647.
- DEUS, B.: Stoffwechselleistungen varianter Stämme pflanzlicher Zellkulturen. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (1980)
- DEUS, B., ZENK, M.H.: Exploitation of Plant Cells for the Production of Natural Compounds. *Biotechnol. Bioeng.* 24 (1982) 1965-1974.
- DEUS-NEUMANN, B., ZENK, M.H.: A Highly Selective Alkaloid Uptake System in Vacuoles of Higher Plants. *Planta* 162 (1984) 250-260.
- DEUS-NEUMANN, B., ZENK, M.H.: Accumulation of Alkaloids in Plant Vacuoles does not Involve an Ion-Trap Mechanism. *Planta* 167 (1986) 44-53.
- EBEL, J., AYERS, A.R., ALBERSHEIM, P.: Host-Pathogen Interactions. XII. Response of Suspension-Cultured Soybean Cells to the Elicitor Isolated from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, a Fungal Pathogen of Soybeans. *Plant Physiol.* 57 (1976) 775-779.
- EILERT, U., EHMKE, A., WOLTERS, B.: Elicitor-Induced Accumulation of Acridone Epoxides in *Ruta graveolens* Suspension Cultures. *Planta Med.* 6 (1984) 459-532.

- EILERT, U., KURZ, W.G.W., CONSTABEL, F.: Stimulation of Sanguinarine Accumulation in Papaver somniferum Cell Cultures by Fungal Elicitors. J. Plant Physiol. 119 (1985) 65-76.
- EILERT, U., CONSTABEL, F.: Ultrastructure of Papaver somniferum Cells Cultured in vitro and Treated with Fungal Homogenate Eliciting Alkaloid Production. Protoplasma 128 (1985) 38-42.
- FURUYA, T., IKUTA, A., SYONO, K.: Alkaloids from Callus Tissue of Papaver somniferum. Phytochemistry 11 (1972) 3041-3044.
- GAMBORG, O.L., MÜLLER, R.A., OJIMA, K.: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Exp. Cell Res. 50 (1968) 151-158.
- GARVE, R., LUCKNER, M., VOGEL, E., TEWES, A., NOVER, L.: Growth Morphogenesis and Cardenolide Formation in Long-term Cultures of Digitalis lanata. Planta Med. 40 (1980) 92-103
- GAUTHERET, R.J.: Sur la possibilite de realiser la Culture indefinie des Tissus de Tubercules de Carotte. C.R. hebdomadaire des Seances Acad. Sci. 208 (1939) 118-120.
- GAUTHERET, R.J.: Plant Tissue Culture: The History. in: Plant Tissue and Cell Culture. 1982. Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture. Fujiwara, A. (ed.) Tokyo (1982) 7-12.
- GOOSSENS, J.F.V., VENDRIG, J.C.: Effects of Abscisinic Acid, Cytokinins and Light on Isoflavonoid Accumulation in Phaseolus vulgaris. Planta 154 (1981) 441-446.
- GREEN, E.R.R.: The Great Famine (1845-1851). In: The Course of Irish History. Moody, T.W., Martin, F.X. (eds.) Cork 1978.
- GUINAND, M., FRANCON, A., VACHERON, M.-J., MICHEL, G.: Enzymatic Preparation of an Immunostimulant, the disaccharide-dipeptide, N-acetyl- β -D-glucosaminyl-(1-4)-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, from a bacterial peptidoglycan. Eur. J. Biochem. 143 (1984) 359-362.

- GUSTINE, D.L.: Evidence of Sulfhydryl Involvement in Regulation of Phytoalexin Accumulation in Trifolium repens Callus Tissue Cultures. Plant Physiol 68 (1981) 1323-1326.
- HABERLANDT, G.: Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsab. Ak. Wiss. Math. Nat. Kl. Wien 111 (1902) 69-92.
- HABERLANDT, G.: Zur Physiologie der Zellteilung. Sitzungsab. Dts. Ak. Wiss. Berlin Math. Phys. 1 (1913) 318-349.
- HAHLBROCK, K., EBEL, J., ORTMANN, J., SUTTER, A., WELLMANN, E., GRISEBACH, H.: Regulation of Enzyme Activities Related to the Biosynthesis of Flavone Glycosides in Cell Suspension Cultures of Parsley (Petroselinum hortense). Biochem. Biophys. Acta 244 (1971) 7-15.
- HAHLBROCK, K., GRISEBACH, H.: Enzymic Controls in the Biosynthesis of Lignin and Flavonoids. Ann. Rev. Plant Physiol. 30 (1979) 105-130.
- HANH, E.F., KREY, A.K.: The Interaction of Alkaloids with DNA. In: Progress in Molecular and Subcellular Biology 2. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1971) 134-151.
- HAHN, M.G., ALBERSHEIM, P.: Host-Pathogen Interactions. XIV. Isolation and Partial Characterization of an Elicitor from Yeast Extracts. Plant Physiol. 62 (1978) 107-111.
- HAHN, M.G., DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P.: Host-Pathogen Interactions. XIX The Endogenous Elicitor, A Fragment of a Plant Cell Wall Polysaccharide, That Elicits Phytoalexin Accumulation in Soybeans. Plant Physiol. 68 (1981) 1161-1169.
- HAHN, M.G., BONHOFF, A., GRISEBACH, H.: Quantitative Localization of Phytoalexin Glyceollin I in Relation to Fungal Hyphae in Soybean Roots Infected with Phytophthora megasperma f. sp. glycinea. Plant Physiol. 77 (1985) 591-601.
- HARTMANN, T.: Prinzipien des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Pl. Syst. Evol. 150 (1985) 15-34.

HEINSTEIN, P.: Future Approaches to the Formation of Secondary Natural Products in Plant Cell Suspension Cultures. *J. of Nat. Products* 48 (1985) 1-9.

HIRAOKA, N., TABATA, M.: Alkaloid Production by Plants Regenerated from Cultured Cells of *Datura innoxia*. *Phytochemistry* 13 (1974) 1671-1675.

HIRAOKA, N., TABATA, M., KONOSHIMA, M.: Formation of Acetyltropine in *Datura* cell cultures. *Phytochemistry* 12 (1973) 795-799.

HUYSTEE, H.: Peroxidase Activity in and from Membranes from Cultured Peanut Cells. *Phytochemistry* 17 (1978) 191-193.

IKEDA, T., MATSUMOTO, T., NOGUCHI, M.: Formation of Ubiquinone-10 by Tobacco Plant Cells in Suspension Culture. *Phytochemistry* 15 (1976a) 568-569.

IKEDA, T., MATSUMOTO, T., NOGUCHI, M.: Studies on Ubiquinone Production by Tobacco Cell Cultures. II. Abst. Ann. Meeting Agr. Chem. Soc. Japan Kyoto, No. 2L-17 (1976b)

IKUTA, A., SYONO, K., FURUYA, T.: Alkaloids from Callus Tissues and Redifferentiated Plantlets in the *Papaveraceae*. *Phytochemistry* 13 (1974) 2175-2179.

ISHII, H., HARADA, K., ISHIDA, T., UEDA, E., NAKAJIMA, K.: The Structure of Chelirubine (Bocconine). *Tetrahedron Lett.* 5 (1975) 319-322.

ITOKAWA, H., TAKEYA, K., AKASU, M.: Studies on the Constituents Isolated from the Callus of *Cannabis sativa* L.. *Japan. J. Pharmacog.* 29 (1965) 106-112.

JIN, D.F., WEST, C.A.: Characteristics of Galacturonic Acid Oligomers as Elicitors of Casbene Synthase Activity in Castor Bean Seedlings. *Plant Physiol.* 74 (1984) 982-992.

- KAUSS, H.: Ca^{2+} -Dependence of Callose Synthesis and the Role of Polyamines in the Activation of 1,3- β -Glucan Synthase by Ca^{2+} . In: Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development. Trewavas, A.J. (ed) Plenum Publishing Corporation (1986) 131-137.
- KEEN, N.T., LONG, M., ERWIN, D.C.: Possible Involvement of a Pathogen Produced Protein Lipopolysaccharide Complex in Verticillium Wilt of Cotton. *Physiol. Plant Pathol.* 4 (1972) 317-331.
- KEEN, N.T.: Specific Elicitors of Plant Phytoalexin Production - Determinants of Race Specificity in Pathogen. *Science* 187 (1975) 74-75.
- KERNER VON MARILAUN, A.: Pflanzenleben 1 & 2. Leipzig/Wien 1890.
- KLEIN, R.M.: Plant Tissue Cultures, A Possible Source of Plant Constituents. *Econ. Botany* 14 (1960) 286-289.
- KOCOUREK, J., BALLOU, C.E.: Method for Fingerprinting Yeast Cell Wall Mannans. *J. of Bacteriol.* 100 (1969) 1175-1181.
- KUTCHAN, T.M., AYABE, S., COSCIA, C.J.: Cyto differentiation and Papaver Alkaloid Accumulation. In: The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. Phillipson, J.D., Roberts, M.F., Zenk M.H. (eds), Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo 1985.
- LANG, H., KOHLENBACH, H.W.: Differentiation of Alkaloid Cells in Cultures of Macleaya Mesophyll Protoplasts. *Planta Med.* 46 (1982) 78-81.
- LAYNE, E.: Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. In: Methods Enzymol. Vol. 3 Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (eds.) Acad. Press, New York (1957) 447-454.
- LEE, S.C., WEST, C.: Polygalakturonase Activity from *Rhizopus stolonifer*, an Elicitor of Casbene Synthase Activity in Castor Bean (*Ricinus communis* L.) Seedlings. *Plant Physiol.* 67 (1981) 633-639.

- LEETE, E., MURRILL, S.J.B.: Incorporation of Dopamine into Chelidonine and Morphine. *Tetrahedron Lett.* 3 (1964) 147-151.
- LINEWEAVER, H., BURK, D.: The Determination of Enzyme Dissoziation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 658-666.
- LINSMAIER, H., SKOOG, F.: Organic Growth Factor Requirement of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 18 (1965) 100-127.
- LIZADA, M.C.C., YOUNG, S.F.: A Simple and Sensitive Assay for l-aminocyclopropane-l-carboxylic acid. *Anal. Biochemistry* 100 (1979) 140-145.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- LUCKNER, M., DIETRICH, B.: Integration of Secondary Metabolism in the Programms of Cell Differentiation and Development - Cardenolide Biosynthesis in Embryogenic Strains of *Digitalis lanata*. In: VI. Int. Congr. of Plant, Tissue and Cell Cult. Abstracts. Somers, D.A., Gengenbach, B.G., Biesboer, D.D., Hackett, W.P., Green, C.E. (eds), Minnesota 1986.
- LUI, J.H., STABA, E.J.: Effects of Precursors on Serially Propagated *Digitalis lanata* Leaf and Root Cultures. *Phytochemistry* 18 (1979) 1913-1916.
- MATILE, PH.: Localization of Alkaloids and Mechanism of their Accumulation in Vacuoles of *Chelidonium majus* Laticifers. *Nova Acta Leopold. Suppl.* 7 (1976) 139-156.
- MATILE, PH.: Biochemistry and Function of Vacuoles. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 29 (1978) 447-458.
- MATILE, PH.: Das toxische Kompartiment der Pflanzenzelle. *Naturwissenschaften* 71 (1984) 18-24.

- MAYAMA, S., TANI, T., UENO, T., HIRABAYASHI, K.,
NAKASHIMA, T., FUKANI, H., MIZUNO, Y., IRIE, H.:
Isolation and Structure Elucidation of Genuine Oat
Phytoalexin Avenalumine I. Tetrahedron Lett. 22
(1981) 2103-2106.
- MIETH, H., SPETH, V., EBEL, J.: Phytoalexin Production
by Isolated Soybean Protoplasts. Z. Naturforsch.
42c (1986) 193-201.
- MIZUKAMI, H., KONOSHIMA, M., TABATA, M.: Variation in
Pigment Production in Lithospermum erythrorhizon
Callus Cultures. Phytochemistry 17 (1978) 95-97.
- MÜLLER, K.O., BÖRGER, H.: Experimentelle Untersuchungen
über die Phytophthora-Resistenz der Kartoffel -
zugleich ein Beitrag zum Problem der "erworbenen
Resistenz" im Pflanzenreich. Arb. biol. Reichsan-
stalt für Land- und Forstwirtschaft 23 (1941)
189-231.
- MÜLLER, E., NEUMANN, D., NELLES, A., BRÄUTIGAM, E.:
Alkaloid Transport and Distribution in Nicotiana
and Macleaya. Diversity and Unity. Nova Acta Leopold.
Suppl. 7 (1976) 133-138.
- MUIR, W.H., HILDEBRANDT, A.C., RIKER, A.J.: Plant
Tissue Cultures produced from Single Isolated
Cells. Science 119 (1954) 877-878.
- NEUMANN, D., KRAUSS, G., HIEKE, M., GRÖGER, D.: Indole
Alkaloid Formation and Storage in Cell Suspension
Cultures of Catharanthus roseus. Planta Med.
48 (1983) 20-23.
- NOBECOURT, P.: Sur les Proliferations spon-
tanees de Fragments de Tubercules de Carotte
et leurs Culture sur Milieu synthetique. Bull.
Soc. Bot. France 81 (1938) 1-7.
- NOTHNAGEL, E.A., McNEIL, M., ALBERSHEIM, P., DELL, A.:
Host-Pathogen Interactions. XXII A Galacturonic
Acid Oligosaccharide From Plant Cell Walls Elicits
Phytoalexins. Plant Physiol. 71 (1983) 916-
926.

- OSSOWSKI, P., PILOTTI, A., GAREGG, P.J., LINDBERG, B.: Synthesis of a Glucoheptose That Elicits Phytoalexin Accumulation in Soybean. *J. of Biol. Chem.* 259 (1984) 11337-11340.
- RING, S.G., SELVENDRAN, R.R.: An Arabinogalactoxyloglucan from the Cell Wall of *Solanum tuberosum*. *Biochemistry* 20 (1981) 2511-2519.
- RASCHKE, W.C., BALLOU, C.E.: Characterization of a Yeast Mannan Containing N-Acetyl-glucosamine as an Immunochemical Determinant. *Biochemistry* 11 (1972) 3807-3816.
- ROBINSON, R.: The Structural Relations of Natural Products. Oxford (1955).
- ROKEM, J.S., GOLDBERG, I.: Secondary Metabolites from Plant Suspension Cultures - Methods for Yield Improvement. *Adv. Biotechnol. Process.* 4 (1985) 241-274.
- RÜFFER, M., EL-SHAGI, H., ZENK, M.H.: (S)-Norlaudanosoline Synthase: The First Enzyme in the Benzylisoquinoline Biosynthetic Pathway. *FEBS Lett.* 129 (1981) 5-9.
- RÜFFER, M., ZENK, M.H.: (S)-Adenosyl-L-Methionin:(S)-7,8,13,14-Tetrahydroprotoberberin-cis-N-Methyltransferase - A Branch Point Enzyme in the Biosynthesis of Benzophenanthridine and Protopin Alkaloids. *Tetrahedron Lett.* 27 (1986) 953-954.
- SCHÜBEL, H., Biosyntheseintermediate als Ausgangsverbindungen biomimetisch orientierter Alkaloidsynthesen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 1986.
- SCHUMACHER, H.M., RÜFFER, M., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: Partial Purification and Properties of (S)-Norlaudanosoline Synthase from *Eschscholtzia tenuifolia* Cell Cultures. *Planta Med.* 48 (1983) 212-220.

- SCHMELZER, E., BÖRNER, H., GRISEBACH, H., EBEL, J.,
HAHLBROCK, K.: Phytoalexin Synthesis in Soybean
(Glycine max). Similar Time Course of mRNA
Induction in Hypocotyls Infected with a Fungal
Pathogen and in Cell Cultures Treated with Fungal
Elicitor. FEBS Lett. 172 (1984) 59-66.
- SHARP, J.K., MCNEILL, M., ALBERSHEIM, P.: The Primary
Structures of One Elicitor-active and Seven Elici-
tor-inactive Hexa(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols
Isolated from the Mycelial Walls of Phytophthora
megasperma f.sp. glycinea. J. of Biol. Chem.
259 (1984) 11321-11336.
- SLAVIK, J., SLAVIKOVA, L.: Alkaloide der Mohngewächse
(Papaveraceae) II. Trennung des Chelerythrins
und Sanguinarins und Auffindung von zwei neuen Al-
kaloiden im Schöllkraut (Chelidonium majus).
Coll. Czech. Chem. Commun. 20 (1955a) 21-26.
- SLAVIK, J., SLAVIKOVA, L.: Alkaloide der Mohngewächse
(Papaveraceae) III. Alkaloide des kaliforni-
schen Kappen-Mohns (Eschscholtzia californica
cham.). Coll. Czech. Chem. Commun. 20
(1955b) 27-31.
- SLAVIK, J., SLAVIKOVA, L.: Alkaloide der Mohngewächse
(Papaveraceae) IV. Alkaloide des gelben Horn-
mohns (Glaucium flavum crantz.). Coll. Czech.
Chem. Commun. 20 (1955c) 32-35.
- SLAVIK, J., SLAVIKOVA, L.: Alkaloide der Mohngewächse
(Papaveraceae) VI. Alkaloide von Macleaya micro-
carpa. Coll. Czech. Chem. Commun. 20 (1955d)
356-361.
- SLAVIK, J., DOLEJS, L., HANUS, V., CROSS, A.D.: Alka-
loids of Papaveraceae XL. Chelirubine, Cheli-
lutine, Sanguirubine and Sanguilutine. Mass and Nu-
clear Magnetic Resonance Spectra of Benzophenanthri-
dine Alkaloids. Coll. Czech. Chem. Commun. 33
(1968) 1619-1622.
- SPURR, A.R.: A Low-Viscosity Epoxy Resin Embedding Me-
dium for Electron Microscopy. J. Ultrastructure Re-
search 26 (1969) 31-43.

- STABA, E.J.: Production of Useful Compounds from Plant Tissue Cultures. in: Plant Tissue and Cell Culture. 1982. Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture. Fujiwara, A. (ed.) Tokyo (1982) 25-31.
- STAHL, E.: Pflanzen und Schnecken. Biologische Studie über die Schutzmittel der Pflanze gegen Schneckenfraß. Jenaer Z. Naturwiss. 22 (1888) 557-684.
- STECK, W., CONSTABEL, F.: Biotransformations in Plant Cell Cultures. Lloydia 37 (1974) 185-191.
- STEFFENS, P., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: Purification and Characterization of the Berberine Bridge Enzyme from *Berberis beaniana* Cell Cultures. Phytochemistry 24 (1985) 2577-2583.
- STERMITZ, F.E., LARSON, K.A., KIM, D.K.: Some Structural Relationships Among Cytotoxic and Antitumor Benzophenanthridinium Salts. J. Med. Chem. 16 (1973) 939-940.
- STERMITZ, F.E., GILLESPIE, J.P., AMOROS, L.G., ROMERO, R., STERMITZ, T.A.: Synthesis and Biological Activity of Some Antitumor Benzophenanthridinium Salts. J. Med. Chem. 18 (1975) 708-713.
- STEWART, F.C., MAPES, M.O., MEARS, K.: Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organisation in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. Am. J. Bot. 45 (1958) 705-708.
- STOESSEL, P., LEUBA, J.L.: Effect of Chitosan, Chitin and Aminosugars on Growth of Various Soil Borne Phytopathogenic Fungi. Phytopathol. Z. (1984) 111 82-90.
- TABATA, M., YAMAMOTO, H., HIRAOKA, N., MARUMOTO, Y., KONOSHIMA, M.: Regulation of Nicotine Production in Tobacco Tissue Culture by Plant Growth Regulators. Phytochemistry 10 (1971) 723-729.
- TABATA, M., YAMAMOTO, H., HIRAOKA, N., KONOSHIMA, M.: Organisation and Alkaloid Production in Tissue Culture of *Scopolia parviflora*. Phytochemistry 11 (1972) 949-955.

- TABATA, M., MIZUKAMI, H., HIRAOKA, N., KONOSHIMA, M.: The Production and Regulation of Shikonin Derivatives in Cultured Cells. Abst. 12th Phytochem. Symp. Japan, Kyoto (1976) a 1-8.
- TABATA, M.: Recent Advances in the Production of Medicinal Substances by Plant Cell Cultures. In: Plant Tissue Culture and its Bio-Technological Application, Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.), Berlin/Heidelberg/New York 1977.
- TAKAO, N., KAMIGAUCHI, M., SUGIURA, M., NINOMIYA, I., MIYATA, O., NAITO, T.: The Structure of the Alkaloid Macaroine. Heterocycles 16 (1981) 221-225.
- TAKAO, N., KAMIGAUCHI, M., OKADA, M.: Biosynthesis of Benzophenanthridine Alkaloids Sanguinarine, Chelirubine and Macarpine. Helv. Chim. Acta 66 (1983) 473-484.
- TEUSCHER, E.: Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe mit Hilfe von Zellkulturen. Pharmazie 28 (1973) 6-18.
- TIETJEN, K.G., MATERN, U.: Induktion and Suppression of Phytoalexin Biosynthesis in Cultured Cells of Safflower, Carthamus tinctorius L., by Metabolites of Alternaria carthami Chowdbury. Arch. Biochem. Biophys. 229 (1984) 136-144.
- TULECKE, W., NICKELL, L.G.: Production of Large Amounts of Plant Tissue by Submerged Culture. Science 130 (1959) 863-864.
- TULECKE, W., NICKELL, L.G.: Methods Problems and Results of Growing Plant Cells under Submerged Conditions. Trans. N. Y. Acad. Sci. 22 (1960) 196-206.
- VAN, K.T.T., TOUBART, P., COUSSON, A., DARVILL, A.G., GOLLIN, D.J., CHELF, P., ALBERSHEIM, P.: Manipulation of the Morphogenetic Pathways of Tobacco Ex-
plants by Oligosaccharins. Nature 314 (1985) 615-617.

- WAGONER, W., LOSCHKE, D.C. HADWIGER, L.A.: Two-dimensional Electrophoretic Analysis of In Vitro Synthesis of Proteins in Peas Inoculated with Compatible and Incompatible Fusarium solani. Physiol. Plant Pathol. 20 (1982) 99-107.
- WANG, C.J., STABA, E.J.: Peppermint and Spearmint Tissue Culture. II. Dual Culture of Spearmint Tissues. J. Pharm. Sci. 52 (1963) 1058-1062.
- WAT, C.-K., STEFFENS, P., ZENK, M.H.: Partial Purification and Characterization of Norreticuline-N-Methyltransferase from Berberis Cell Suspension Cultures. Z. Naturforsch. 41c (1986) 126-134.
- WEILER, E.W.: Radioimmuno-Screening Methods for Secondary Plant Products. In: Plant Cell Culture and its Bio-Technological Application. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.), Berlin/Heidelberg/New York 1977.
- WEST, C.A.: Fungal Elicitors of the Phytoalexin Response in Higher Plants. Naturwissenschaften 68 (1981) 447-457.
- WIJNSMA, R., VAN DER LEER, T., VAN DER HEIJDEN, R., HARKESP, A., VERPOORTE, R., BAERHEIM-SVENDSEN, A.: Effects of Feeding of Indole Alkaloid Precursors and Corynantheal on the Growth and Secondary Metabolism of Cinchona ledgeriana Cell Suspension Cultures. In: VI. Int. Congr. of Plant, Tissue and Cell Cult. Abst., Somers, D.A., Gengenbach, B.G., Biesboer, D.D., Hackett, W.P., Green C.E. (eds.) Minnesota 1986.
- WINK, M., HARTMANN, T.: Diurnal Fluctuation of Quinolizidine Alkaloid Accumulation in Legume Plants and Photomixotrophic Cell Suspension Cultures. Z. Naturforsch. 37 Teil C (1982) 369-375.
- WINK, M.: Wounding-induced Increase of Quinolizidine Alkaloid Accumulation in Lupin Leaves. Z. Naturforsch. 38c (1983a) 905-909

- WINK, M., WITTE, L.: Evidence for a wide-spread occurrence of the genes of quinolizidine alkaloid biosynthesis. Induction of alkaloid accumulation in cell suspension cultures of alkaloid-'free' species. *FEBS Lett.* 159 (1983b) 196-200.
- WINTERSTEIN, E., TRIER, G.: *Die Alkaloide*. Bornträger, Berlin 1910.
- WOLTERS, B., EILERT, U. Acridonepoxidgehalte in Kalluskulturen von *Ruta graveolens* und ihre Steigerung durch Mischkultur mit Pilzen. *Z. Naturforsch.* 37c (1982) 575-583.
- YOUNG, D.H., KÖHLE, H., KAUSS, H.: Effect of Chitosan on Membrane Permeability of Suspension Cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* Cells. *Plant Physiol.* 70 (1982) 1449-1454.
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., SCHULTE, U.: Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Med. Suppl.*, (1975) 79-101.
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., DEUS, B.: Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. In: *Plant Tissue Culture and its Bio-Technological Application*. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.), Berlin/Heidelberg/New York 1977.
- ZENK, M.H.: The Impact of Plant Cell Culture on Industry. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Proc. 4th Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture. Thorpe, T.A. (ed.) Calgary (1978) 1-13.
- ZENK, M.H., DEUS, B.: Natural Product Synthesis by Plant Cell Culture. In: *Plant Tissue and Cell Culture*. 1982. Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture. Fujiwara, A. (ed.) Tokyo (1982) 391-392.

Danksagung

Meinem Lehrer Prof. Zenk danke ich für Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen, vor allem aber für seine ständige Anteilnahme am Fortgang dieser Arbeit und zahlreiche wertvolle Anregungen.

Ohne den Rückgriff auf die an seinem Institut erarbeiteten Methoden und das damit erworbene Wissen über die Biosynthese der Alkaloide wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen.

Gedankt sei deshalb auch allen Mitarbeitern des Instituts für Rat und Unterstützung, insbesondere Frau Dr. Rüffer. Frau Löffler und Herrn Frenzel sei außerdem für die Überlassung wichtiger Enzymsubstrate gedankt.

Prof. Dr. N. Amrhein, Bochum, und seinen Mitarbeitern danke ich für wertvolle Hilfe und Bereitstellung notwendiger Geräte für die Ethylen- und ACC-Messung.

Für die Überlassung bakt. Zellwandpräparate aus seiner Sammlung, aber auch für nützliche Ratschläge bin ich Prof. F. Fiedler, München, zu Dank verpflichtet.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Prof. Wagner, München, und seinem Mitarbeiter Dr. Stuppner für Hilfe bei der Zuckeranalyse.

Zum Abschluß möchte ich Dr. G. Wanner danken für die Zusammenarbeit bei der Elektronenmikroskopie und nicht zuletzt für interessante Diskussion und freundliche Aufnahme.

Die Zellkulturarbeiten im Zusammenhang mit dieser Dissertation wurden vom BMFT, die Arbeiten zur Alkaloidchemie durch den SFB "Biokonversion" an der Universität München gefördert. Empfänger der Geldmittel war Prof. Dr. Zenk.

Lebenslauf:

Am 21. 2. 1955 wurde ich, Heinz Martin Schumacher als Sohn der Eheleute Karl-Heinz Schumacher und Margarete Schumacher, geb. Kirschsieper, in Hückeswagen geboren.

In den Jahren 1962 - 1966 besuchte ich zunächst die Volksschule und dann bis 1971 die städtische Realschule in Radevormwald. Von 1971 bis 1974 besuchte ich die Leibniz-Schule in Remscheid, wo ich im Jahr 1974 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1974 bis 1975 leistete ich den Grundwehrdienst in Hilden/Rheinland ab.

Im Wintersemester 1975 nahm ich ein Lehramtsstudium mit der Fächerkombination Biologie und Chemie an der Ruhr-Universität, Bochum, auf, das ich am 6. 5. 1982 mit der Ablegung des I. Staatsexamens für das Lehramt an der Sekundarstufe II ebendort beendete.

Im August des Jahres 1982 begann ich unter Anleitung von Prof. Dr. M.H. Zenk mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation.

Seit dieser Zeit bin ich als teilzeitbeschäftigte, wissenschaftliche Hilfskraft an der Ludwig-Maximilians Universität, München, beschäftigt.

